

JP06169780A

MicroPatent Report**GENE DNA PARTICIPATING IN INTEGRATION OF  
MEMBRANEOUS PROTEIN TO MEMBRANE**

<p>[71] <b>Applicant:</b> MITSUBISHI PETROCHEM CO LTD</p> <p>[72] <b>Inventors:</b> HONNO NOBUTAKE; KOBAYASHI MIKI; YUGAWA HIDEAKI</p> <p>[21] <b>Application No.:</b> JP04326927</p> <p>[22] <b>Filed:</b> 19921207</p> <p>[43] <b>Published:</b> 19940621</p>	<p>[No drawing]</p>
<p><b>Go to Fulltext</b></p>	

**[57] Abstract:**

PURPOSE: To obtain a gene DNA derived from coryneform bacteria effective for participating in an integration of membranous protein to membrane. CONSTITUTION: A secY gene DNA is isolated from *Brevibacterium flavum* MJ-233. The base sequence of the gene is determined and stable plasmid pCRY 30-secY is formed in the coryneform bacteria having this gene DNA segment.

[51] **Int'l Class:** C12N01531 C07K01300 C12N00121 C12N01577  
C12P02102 C12N00121 C12R00113 C12P02102 C12R00113

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-169780

(43)公開日 平成6年(1994)6月21日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 15/31	ZNA			
C 07 K 13/00		8517-4H		
C 12 N 1/21		7236-4B		
15/77				
	8931-4B	C 12 N 15/00	A	
		審査請求 未請求 請求項の数 8(全 14 頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号 特願平4-328927  
(22)出願日 平成4年(1992)12月7日  
特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年11月17日  
社団法人日本生物工学会開催の「平成4年度日本生物工学会大会」において文書をもって発表

(71)出願人 000006057  
三菱油化株式会社  
東京都千代田区丸の内二丁目5番2号  
(72)発明者 岩野 信剛  
茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号  
三菱油化株式会社筑波総合研究所内  
(72)発明者 小林 幹  
茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号  
三菱油化株式会社筑波総合研究所内  
(72)発明者 湯川 英明  
茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号  
三菱油化株式会社筑波総合研究所内  
(74)代理人 弁理士 山本 隆也

(54)【発明の名称】 膜蛋白質の膜への組み込みに関与する遺伝子DNA

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 コリネ型細菌由来の膜蛋白質の膜への組み込みに関与する遺伝子DNAの提供。

【構成】 プレビバクテリウム・フラバムMJ-233からセックワイ(s e c Y)遺伝子DNAを単離し、この遺伝子の塩基配列を決定し、該遺伝子DNA断片を有するコリネ型細菌内で安定なプラスミドpCRY30-s e c Yを構築した。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 コリネ型細菌由来の膜蛋白質の膜への組み込みに関する遺伝子DNA。

【請求項 2】 コリネ型細菌がブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ 233 である請求項 1 記載の遺伝子DNA。

【請求項 3】 膜蛋白質の膜への組み込みに関する遺伝子がセックワイ (secY) である請求項 1 記載の遺伝子DNA。

【請求項 4】 次のDNA塩基配列で示されるセックワイ (secY) 遺伝子DNA。

GTGTCGGCCA TTATTCAGGC ATTCAGGAC GCGGATCTGC GTAAGAAGAT TTTCTTCACT 60  
ATCGCAATGA TCGTTCTATA CGGCATCGT GCGCAGATCC CTTCGGCGG AGTTGACTAT 120  
GCAACGATTA GTGGTCTGCT CGGTACTTG ACTCAGGATC AGTCAAGCGT TTATTCGCTG 180  
ATTAAACCTGT TTTCCGGTGG AGCGCTGCTG CAGCTGTCCA TTTTGCTAT TGGTATCATG 240  
CCGTACATCA CGGCGCTCAT TATCGTGCAG CTGCTGACTG TGGTTATTCC ACACCTTGAG 300  
GAGTTGAAGA AGGAAGGCCA GTCTGCCAG GCGAAGATGA TCCAGTACAC CAGGTACTTA 360  
ACGGTTGCCCT TGGCGTTGCT TCAGTCTTCG GGCATCGTGG CGTTGGCGGA CGGTGAGCAG 420  
CTGCTTGGCG CAGGCATTCG CGTGTGCTG GCTGATCGCA ACTTCTTCGA CCTCATTGTT 480  
TGGTCTATCA CCATGACTTC CGGTGCACTG CTGCTGATGT GGATGGGTGA GCTCATCAGC 540  
GAAAGGGCG TAGGCAATGG TATGTCGCTG CTGATTTCG CTGGTATCGC AACTCGCCTC 600  
CCAACTGATG GCATGAACAT TCTGGCAAC TCCGGGGCG TGGTTTCCG TGTGTTCTG 660  
GCTTCCGGTC TGATCTGGT CATTGGTGT GTATTCGTT ACCAGGGCCA CGCTGCTATT 720  
CCAGTGCAGT ACGCAACAGCG CATGGTGGGT CGTCGTCAGT ACGGTGGTTC TTCCACTTAC 780  
CTGCTTCTGA AGGTCAACCA AGCTGGTGT ATCCAGTGA TCTTCGGTC TTCCCTGATT 840  
TACATGCCAG TGCTGATTAC TCAGATCGTG AACTCTGGTT CGCTGGAAGT GTCTGATAAC 900  
TGGTGGCAGC GCAACATCAT TGGCACCTG CAGACGCCCT CTTCCTGGCA GTACATTGTT 960  
TTGACTTTG CACTGACCAT CTTCCTCTCT TACTTCTATG TTTCTGTTCA GTATGATCCA 1020  
GCTGAGCAGG CTGAAACAT GAAGAAGTAC GGCAGGATTTA TCCCTGGTAT TCGTCCGGC 1080  
CGTCGACTG CTGAGTACTT GGGATTGCTG ATGAACGCC TGGTGTGTTG TGGTTCCCTG 1140  
TACCTGGCTG TCATTGCTGT GCTGCAAAC ATTATGCTGG ATCTAGGTGT TGACGGCGGT 1200  
TCGGCCGGAG CAACTCCATT CGGCCGAACC GCAATCTGA TTCTTGATC TGTTGCACTG 1260  
ACCACAGTGA AGCAGATTGA GAGCCAGCTC CTGCAAAGCA ACTACGAAGG ACTTCTAAAA 1320  
TAA

【請求項 5】 次のアミノ酸配列で示されるセックワイ (secY) 遺伝子DNA。

Val Ser Ala Ile Ile Gln Ala Phe Lys Asp Ala Asp Leu Arg Lys Lys  
1 5 10 15  
Ile Phe Phe Thr Ile Ala Met Ile Val Leu Tyr Arg Ile Gly Ala Gln  
20 25 30  
Ile Pro Ser Pro Gly Val Asp Tyr Ala Thr Ile Ser Gly Arg Leu Arg  
35 40 45  
Asp Leu Thr Gln Asp Gln Ser Ser Val Tyr Ser Leu Ile Asn Leu Phe  
50 55 60  
Ser Gly Gly Ala Leu Leu Gln Leu Ser Ile Phe Ala Ile Gly Ile Met  
65 70 75 80  
Pro Tyr Ile Thr Ala Ser Ile Ile Val Gln Leu Leu Thr Val Val Ile  
85 90 95  
Pro His Phe Glu Glu Leu Lys Lys Glu Gly Gln Ser Gly Gln Ala Lys  
100 105 110  
Met Met Gln Tyr Thr Arg Tyr Leu Thr Val Ala Leu Ala Leu Leu Gln  
115 120 125  
Ser Ser Gly Ile Val Ala Leu Ala Asp Arg Glu Gln Leu Leu Gly Ala  
130 135 140  
Gly Ile Arg Val Leu Ser Ala Asp Arg Asn Phe Phe Asp Leu Ile Val  
145 150 155 160

Leu Val Ile Thr Met Thr Ala Gly Ala Val Leu Val Met Trp Met Gly  
 165 170 175  
 Glu Leu Ile Thr Glu Lys Gly Val Gly Asn Gly Met Ser Leu Leu Ile  
 175 180 185  
 Phe Ala Gly Ile Ala Thr Arg Leu Pro Thr Asp Gly Met Asn Ile Leu  
 190 195 200  
 Gly Asn Ser Gly Gly Val Val Phe Ala Val Val Leu Ala Ser Val Leu  
 205 210 215  
 Ile Leu Val Ile Gly Val Val Phe Val Glu Gln Gly Gln Arg Arg Ile  
 220 225 230 235  
 Pro Val Gln Tyr Ala Lys Arg Met Val Gly Arg Arg Gln Tyr Gly Gly  
 240 245 250  
 Ser Ser Thr Tyr Leu Pro Leu Lys Val Asn Gln Ala Gly Val Ile Pro  
 255 260 265  
 Val Ile Phe Ala Ser Ser Leu Ile Tyr Met Pro Val Leu Ile Thr Gln  
 270 275 280  
 Ile Val Asn Ser Gly Ser Leu Glu Val Ser Asp Asn Trp Trp Gln Arg  
 285 290 295  
 Asn Ile Ile Ala His Leu Gln Thr Pro Ser Ser Trp Gln Tyr Ile Val  
 300 305 310 315  
 Leu Tyr Phe Ala Leu Thr Ile Phe Phe Ser Tyr Phe Tyr Val Ser Val  
 320 325 330  
 Gln Tyr Asp Pro Ala Glu Gln Ala Glu Asn Met Lys Lys Tyr Gly Gly  
 335 340 345  
 Phe Ile Pro Gly Ile Arg Pro Gly Arg Pro Thr Ala Glu Tyr Leu Gly  
 350 355 360  
 Phe Val Met Asn Arg Leu Leu Phe Val Gly Ser Leu Tyr Leu Ala Val  
 365 370 375  
 Ile Ala Val Leu Pro Asn Ile Met Leu Asp Leu Gly Val Asp Ala Gly  
 380 385 390 400  
 Ser Ala Gly Ala Thr Pro Phe Gly Gly Thr Ala Ile Leu Ile Leu Val  
 405 410 415  
 Ser Val Ala Leu Thr Thr Val Lys Gln Ile Glu Ser Gln Leu Leu Gln  
 420 425 430  
 Ser Asn Tyr Glu Gly Leu Leu Lys  
 435 440

【請求項6】 請求項1～5のいずれかに記載の遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド。

【請求項7】 請求項1～5のいずれかに記載の遺伝子DNAと、コリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNAを保有する組換えプラスミド。

【請求項8】 請求項7記載のプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、コリネ型細菌由来の膜蛋白質の膜への組み込みに関与する遺伝子DNAに関し、さらに詳しくは膜蛋白質の膜への組み込みに関与する主要な遺伝子の1つセックワイ (secY) 遺伝子に関する。secY遺伝子産物は、膜蛋白質、分泌蛋白質

が各々、細胞膜内へ組み込まれる、菌体外へ分泌される過程に必要不可欠な遺伝子である。該遺伝子を利用するにより、膜蛋白質の膜中含量の増加、分泌蛋白質の菌体外分泌量の増加が期待される。また、膜蛋白質、例えば酸化還元酵素の含量増加により、高活性を有する高性能生体触媒として菌体を利用し、部位特異的酸化還元等による様々な物質生産に応用することが可能である。

【0002】

【従来の技術】 蛋白質の膜への組み込み及び分泌に関する機構は、エシエリヒア・コリ (Escherichia coli) においてよく研究されており [Annual Review Genetics 24, 215-248, 1990. Annual Review of Biochemistry, 60, 101-124,

1991]、蛋白質の膜への組み込みに関する遺伝子として *secA* [Journal of Bacteriology, 150, 686-691, 1982]、*secB* [Journal of Bacteriology, 154, 254-260, 1983]、*secD* [Journal of Bacteriology, 169, 1286-1290, 1987]、*secE* [Genetics, 118, 571-579, 1988]、*secF* [EMBO Journal, 9, 3209-3216, 1990]、*secY* [Nucleic Acids Research, 11, 2599-2616, 1983] 等が知られている。

【0003】これらの中で *secA*、*E*、*Y* 遺伝子は、各種変異株を用いた研究により蛋白質の膜への組み込み特に重要な役割を演じていることが示されている。上記 *secY* 遺伝子としては、エシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 由来の遺伝子 [Nucleic Acids Research, 11, p. 2599-2616, 1983 参照]、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) 由来の遺伝子 [Journal of Biochemistry, 107, p. 603-607, 1990 参照] 等が単離されている。しかしながら、産業上重要な細菌であるコリネ型細菌由来の *secY* 遺伝子については、従来の報告例は見当らない。

【0004】一般に、膜蛋白質は細胞膜中より抽出した場合不安定であり、生体触媒として利用するには限界がある。特定膜蛋白質の膜中含量のみを増加させることができれば、高含量の膜、もしくは微生物自体を触媒として利用することができる。しかしながら、膜蛋白質を微生物細胞内で高発現させても、細胞質内でインクルージョン・ボディ (inclusion body) を形成し、細胞膜内へ組み込まれない。膜蛋白質を高発現させ、膜内に安定に保持させるためには、蛋白質の膜への組み込み系を強化する必要があると考えられるが、コリネ型細菌由来の膜組み込み系についての知見がなく、また、多種由来の膜組み込み系は、コリネ型細菌中で十分に機能しないと考えられる [Molecular Microbiology, 4, 305-314, 1990, FEBS Letters, 273, 75-78, 1990 参照]。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、上記問題点を解決すべく、銳意研究を重ねた結果、コリネ型細菌由来の膜蛋白質の膜への組み込みに関する遺伝子を単離し、改変することにより、特定膜蛋白質の膜中含量増加を達成できると考え、コリネ型細菌由来の膜蛋白質の膜への組み込みに関する主要な遺伝子である *secY* 遺伝子 DNA を単離することに成功し、本発明を完成するに至った。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】かくして本発明によれば、(1) コリネ型細菌由来の膜蛋白質の膜への組み込みに関する遺伝子 DNA、(2) 該遺伝子 DNA が導入された組換えプラスミド及び(3) 該組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌が提供される。

【0007】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。本発明の「膜蛋白質の膜への組み込みに関する遺伝子 DNA」とは、細胞膜中蛋白質の膜への組み込み、菌体外分泌蛋白質の分泌に関する装置を構成する主要成分をコードする遺伝子 DNA を意味するものである。該主要成分をコードする遺伝子 DNA である *secY* 遺伝子 DNA を含む DNA 断片 (以下、これを「A 断片」と略称することがある) は、その塩基配列が決定された後においては合成することも可能であるが、通常は微生物からクローニングされる場合が多く、その供給源となる微生物としては、コリネ型細菌が有利に使用される。

【0008】これらの供給源微生物から A 断片を調製するための基本操作の一例を述べれば次のとおりである: A 断片は、上記コリネ型細菌、例えばブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flava*) MJ-233 (FERM BP-1497) 株の染色体上に存在し、この染色体を適当な制限酵素で切断することにより生ずる切断断片の中から以下に述べる方法で、分離取得することができる。

【0009】先ず、ブレビバクテリウム・フラバム MJ-233 株の培養物から染色体 DNA を抽出する。この染色体 DNA を適当な制限酵素、例えば *EcoRI* を用いて染色体 DNA を完全に分解する。得られる DNA 断片をクローニングベクター、例えば *pUC118* (宝酒造製) に挿入し、このベクターを用いてエシエリヒア・コリ JM109 (宝酒造製) を形質転換し、形質転換体を取得する。

【0010】得られる形質転換体よりプラスミド DNA を抽出し、エシエリヒア・コリ、バチルス・サチルス由来 *secY* 遺伝子の共通領域配列をプローブとして用いるサザンハイブリダイゼーションにより、挿入されたブレビバクテリウム・フラバム MJ-233 株染色体由来の A 断片を確認・取得することができる。かくして得られる A 断片をさらに適当な制限酵素を用いて切断し、得られる DNA 断片を同種のベクターに挿入し、エシエリヒア・コリ JM109 を形質転換する。得られる形質転換体よりプラスミド DNA を抽出し、ハイブリダイゼーションにより挿入されたブレビバクテリウム・フラバム MJ-233 株染色体由来の A 断片を確認・取得することができる。

【0011】このようにして得られる A 断片の一つは、上記ブレビバクテリウム・フラバム MJ-233 株の染色体 DNA を制限酵素 *EcoRI* の完全分解により切り出し、さらにそれを制限酵素 *KpnI* で切断又は制限酵

素KpnIで直接切断することによって得られる大きさが約1.5kbのDNA断片を挙げることができる。この約1.5kbのsecY遺伝子DNAを含むDNA断片を、各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記第1表に示す。

【0012】

【表1】

第1表

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BalI	1	0.4, 1.1
PstI	2	0.3, 0.5, 0.7
SacI	1	0.6, 0.9
SmaI	1	0.2, 1.3

【0013】なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0014】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのラムダファージ(λ phage)のDNAを制限酵素 HindIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上で泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ(Φ x 174 phage)のDNAを制限酵素HaeIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上で泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片のそれぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果を採用し、約0.1kbから1kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0015】一方、上記のプレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAを制限酵素EcoRI、KpnIによって切断又は制限酵素KpnIで直接切断することにより得られる大きさが約1.5kbのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119(宝酒製造)を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法(dideoxy chain termination法、Sanger, F. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 74, 5463, 1977)により決定することができる。このようにして決定した上記約1.5kbのDNA断片の塩基配列のオープンリーディングフレームの

存在から決定したsecY遺伝子DNAは、後記配列表の配列番号1に示す配列を有するものであり、440個のアミノ酸をコードする1320の塩基対から構成される。

【0016】上記の塩基配列を包含する本発明のsecY遺伝子を含むDNA断片は、天然のコリネ型細菌染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばベックマン社製System-1 Plusを用いて合成されたものであってよい。

【0017】また、前記の如くプレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAから取得される本発明の膜蛋白質の膜への組み込みに関与する遺伝子DNAは、secY遺伝子産物の機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されてもよく又は削除されてもよく、或いは新たに塩基が挿入されてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明の遺伝子DNAに包含されるものである。

【0018】以上に詳述した大きさが約1.5kbのDNA断片の制限酵素による切断点地図を図1に示す。本発明のsecY遺伝子DNAを含むDNA断片(A断片)は、適当なプラスミド、例えば、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でsecY遺伝子産物の高発現可能な組換えプラスミドを得ることができる。

【0019】また、本発明のsecY遺伝子を発現させるためのプロモーターはコリネ型細菌が保有するプロモーターであることができるが、それに限られるものではなく、secY遺伝子の転写を開始させるための原核生物由来の塩基配列であればいかなるプロモーターであってもよい。

【0020】本発明のA断片を導入することができる、コリネ型細菌内での複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターとしては、例えば、特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30;特開平2-276575号公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX;特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2及びpCRY3;特開昭58-67679号公報に記載のpAM330;特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519;特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844;特開昭57-134500号に記載のpCG1;特開昭58-35197号公報に記載のpCG2;特開昭57-183799号公報に記載のpCG4及びpCG11等を挙げることができる。

【0021】中でもコリネ型細菌の宿主ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を持つものが好ましく、例えば、プラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX等が好適に使用される。

【0022】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法としては、プレビバクテリウム・スタチオニス (*Brevibacterium stationis*) IFO12144 (FERM BP-2515) からプラスミドpBY503 (このプラスミドの詳細については特開平1-95785号公報参照) DNAを抽出し、制限酵素XbaIで大きさが約4.0 kbのプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出し、制限酵素EcoRIおよびKpnIで大きさが約2.1 kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出す。これらの両断面をプラスミドpHSG298 (宝酒造製) のEcoRI-KpnI部位及びSalI部位に組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0023】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のA断片の導入は、例えばプラスミドベクター中に1個所だけ存在する制限酵素部位を、該制限酵素を開裂し、そこに前記A断片および開裂したプラスミドベクターを必要に応じてS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするか、または適当なアダプター-DNAの存在下にDNAリガーゼ処理で連結させることにより行うことができる。

【0024】プラスミドpCRY30への本発明のA断片の導入は、プラスミドpCRY30を制限酵素EcoRIで開裂させ、そこに前記secY遺伝子DNAを含むDNA断片 (A断片) をDNAリガーゼで連結させることにより行うことができる。このようにして造成されるプラスミドpCRY30に本発明の大きさが約1.5 kbのA断片を導入した組換えプラスミドをpCRY30-secYと命名した。プラスミドpCRY30-secYの作成方法の詳細については、後記実施例4で説明する。

【0025】本発明によるプラスミドで形質転換しうる宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497)、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-AB-41 (FERM BP-1498)、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-ABT-11 (FERM BP-1500)、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-ABD-21 (FERM BP-1499) 等が挙げられる。

【0026】なお、上記のFERM BP-1498の

菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としてDL- $\alpha$ -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール資化性微生物である (特公昭59-28398号公報第3~4欄参照)。また、FERM BP-1500の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としたL- $\alpha$ -アミノ酪酸トランスアミナーゼ高活性変異株である (特開昭62-5198号公報参照)。さらに、FERM BP-1499の菌株はFERM BP-1497の菌株を親株としたD- $\alpha$ -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株である (特開昭61-177993号公報参照)。

【0027】これらの微生物の他に、プレビバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC6871、同ATCC13745、同ATCC13746; プレビバクテリウム・デバリカタム (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC14020; プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869; コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831等を宿主微生物として用いることもできる。

【0028】なお、宿主としてプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来の菌株を用いる場合、本菌株が保有するプラスミドpBY502 (特開昭63-36787号公報参照)のため、形質転換が困難である場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。そのようなプラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより自然に欠失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である [Bact. Rev. 36 p. 361~405 (1972) 参照]。上記プラスミドpBY502を人為的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。

【0029】宿主プレビバクテリウム・フラバムMJ-233の生育を不完全に阻害する濃度のアクリジンオレンジ (濃度: 0.2~50  $\mu$ g/ml) もしくはエチジウムプロミド (濃度: 0.2~50  $\mu$ g/ml) 等を含む培地に、1ml当たり約10細胞になるように植菌し、生育を不完全に阻害しながら約24時間約35°Cで培養する。培養液を希釀後寒天培地に塗布し、約35°Cで約2日培養する。出現したコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミドpBY502が除去されている株を選択する。この操作によりプラスミドpBY502が除去されたプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株が得られる。

【0030】このようにして得られるプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株への前記プラスミドの形質転換法としては、エシェリヒア・コリ及びエルビ

ニア・カロトボラについて知られているように [Calvin, N. M. and Hanawalt, P. C., *Journal of Bacteriology*, 170, 2796 (1988); Ito, K., Nishida, T. and Izaki, K., *Agricultural and Biological Chemistry*, 52, 293 (1988) 参照]、DNA受容菌へのパルス波通電 [Satoh, Y. et al., *Journal of Industrial Microbiology*, 5, 159 (1990) 参照] によりプラスミドを導入することが可能である。

【0031】上記の方法で形質転換して得られる *sec Y* 遺伝子産物生産能を有するコリネ型細菌、例えばプレビパクテリウム・フラバムMJ-233由来株の培養方法を以下に述べる。培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通常の栄養培地で行うことができ、炭素源としては、例えばグルコース、エタノール、メタノール、瓈糖蜜等が、そして窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素等がそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また、無機塩としては、例えばリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスティーブリカ、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等の栄養素を培地に添加することができる。

【0032】培養は、通常、通気攪拌、振盪等の好気条件下に、約20～約40℃、好ましくは約25℃～約35℃の温度で行うことができる。培養途中のpHは5～10、好ましくは7～8付近とることができ、培養中のpH調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。培養開始時の炭素源濃度は、好ましくは1～5容量%、更に好ましくは2～3容量%である。また、培養期間は通常1～7日間とることができ、最適期間は3日間である。

【0033】かくして得られる培養物から遠心分離等により菌体を集めることにより、*sec Y* 遺伝子産物を高含有する菌体を取得することができる。

#### 【0034】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。

##### 実施例1

プレビパクテリウム・フラバムMJ-233由来の *sec Y* 遺伝子DNAを含むDNA断片（A断片）のクローニング化

##### （A）プレビパクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

半合成培地A培地【組成：尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g、 $\text{MgSO}_4$  0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6m

g、 $\text{MnSO}_4$  4～6 $\text{H}_2\text{O}$  6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ビオチン200 $\mu\text{g}$ 、塩酸チアミン200 $\mu\text{g}$ 、グルコース20g、蒸留水11】11に、プレビパクテリウム・フラバムMJ-233（FERM BP-1497）を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む10mM  $\text{NaCl}$  - 20mMトリス緩衝液（pH8.0）- 1mM EDTA・2Na溶液15mlに懸濁した。次にプロテナーゼKを、最終濃度が100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  になるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間保温して溶菌した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離（5,000×g、20分間、10～12℃）し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10mMトリス緩衝液（pH7.5）- 1mM EDTA・2Na溶液5mlを加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

##### 【0035】（B）組換え体の創製

上記（A）項で得たプレビパクテリウム・フラバムMJ-233の全DNA溶液の90 $\mu\text{l}$ を制限酵素EcoRI 50unitsを用い、37℃で1時間反応させ完全分解した。このEcoRI分解DNAにクローニングベクターpUC118（宝酒造より市販）を制限酵素EcoRIで切断した後、脱リン酸化処理したものを混合し、50mMトリス緩衝液（pH7.6）、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>及びT<sub>4</sub> DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し（各成分の濃度は最終濃度である）、4℃で15時間反応させ、結合させた。

【0036】上記（B）項で得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法（Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970）によりエシェリヒア・コリJM109（宝酒造製）を形質転換し、アンビシリン50mgを含む培地【トリプトン10g、イーストエキストラクト5g、NaCl 5g及び寒天16gを蒸留水11に溶解】に塗抹した。

【0037】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲルを用いて泳動した。このアガロースゲルよりDNAをナイロンメンブレン上に移しとり、エシェリヒア・コリ、バチルスサチルス由来 *sec Y* 遺伝子の共通領域をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行なった。用いたプロ

ープとしては、エシェリヒア・コリ、バチルス・サチルス由来のsec Y遺伝子から推定されるアミノ酸配列で特に相同性の高い領域に注目し、そのアミノ酸配列より想定される混合オリゴヌクレオチドプローブをアプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製394 DNA/RNAシンセサイザ (synthesizer) を用いて合成した。

【0038】実際に用いたプローブの塩基配列は、次のアミノ酸配列：

Ala Gly Val Ile Pro Val Ile Phe Ala

より想定される下記の塩基配列：

GCG GGT GTI ATH CCG GTI ATH TTY GC

(配列中、HはA又はC又はT、YはC又はTを示し、ここでAはアデニン、Gはグアニン、Cはシトシン、Tはチミン、Iはデオキシイノシンを示す。) の26mer (26塩基対) である。なお、プローブの合成にあたっては、混合の度合が著しくなりすぎぬようデオキシイノシンを用いた。

【0039】合成した上記オリゴヌクレオチドプローブをT4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製) を用いる手法で、5'末端リン酸基を [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATPでラジオアイソトープラベルした [Analytical Biochemistry, 158, 307-315, 1986]。サザンハイブリダイゼーションは、常法 [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] の通り行なった。この結果、ポジティブなバンドを生ずるクローンを選定することができ、プラスミドpUC118の長さ3.2kbのDNA断片に加え、長さ約4.2kbの挿入断片が認められた。

【0040】本プラスミドをpUC118-Y-fragと命名した。

(D) sec YDNA遺伝子を含むDNA断片 (A) 断片のサブクローニング

第2表 プラスミドpUC118-sec Y

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamH I	1	4.7
Sac I	2	4.1, 0.6
Pst I	3	3.5, 0.7, 0.5

【0046】上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpUC118-sec Yと命名した。以上によりsec Y遺伝子DNAを含む大きさが約1.5kbのDNA断片 (Kpn I断片) を得ることができた。

【0047】実施例2

sec Y遺伝子DNAの塩基配列の決定

実施例1の(D)項で得られたsec Y遺伝子DNAを含む長さが約1.5kbのDNA断片について、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119 (宝酒造製) を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法

上記(C)項で得たプラスミドpUC118-Y-fragに含まれるDNA挿入断片を、必要な部分だけに小型化するために、プラスミドpUC118 (宝酒造より市販) へsec Y遺伝子DNAを含むDNA断片を下記のとおりサブクローニングした。

【0041】上記(C)項で得たプラスミドpUC118-Y-fragを制限酵素Kpn Iで切断したものと、プラスミドpUC118を制限酵素Kpn Iで切断したものを混合し、50mMトリス緩衝液 (pH 7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>及びT4DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、12°Cで15時間反応させ、結合させた。

【0042】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) により前記エシェリヒア・コリJM109を形質転換し、アンビシリン50mgを含む培地 [トリプトン10g、イーストエキストラクト5g、NaCl 5g及び寒天16gを蒸留水1Lに溶解] に塗抹した。

【0043】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、ハイブリダイゼーション法を用いて調べたところ、プラスミドpUC118の長さ3.2kbのDNA断片に加え、長さ約1.5kbの挿入DNA断片が認められた。各種の制限酵素で切断したときの、長さ約1.5kbのDNA断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは前記表1に示したとおりであった。このDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。

【0044】また上記で得たプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の第2表に示す。

【0045】

【表2】

(dideoxy chain termination法) (Sanger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977) により図2に示した戦略図に従って決定した。

【0048】その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、sec Y遺伝子DNAは、後記配列表の配列番号1に示す塩基配列を有する440個のアミノ酸をコードする1320の塩基対より構成されていることが判明した。

【0049】実施例3

コリネ型細菌内で複製し安定なプラスミドベクターp C RY 3 0の作成

(A) プラスミドp BY 5 0 3の調製

プラスミドp BY 5 0 3は、プレビバクテリウム・スタチオニスIFO 1 2 1 4 4 (FERM BP-2 5 1 5) から分離された分子量約10メガダルトンのプラスミドであり、特開平1-95785号公報に記載のようにして調製した。

【0050】半合成培地A培地 [尿素2g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g、MgSO<sub>4</sub> 0.5g、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 6mg、MnSO<sub>4</sub> · 4~6H<sub>2</sub>O 6mg、酵母エキス2.5g、カゼミノ酸5g、ビチオン200μg、塩酸チアミン200μg、グルコース20g及び蒸留水1l] 1lに、プレビバクテリウム・スタチオニスIFO 1 2 1 4 4を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む緩衝液 [25mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、10mM EDTA、50mMグルコース] 20mlに懸濁し、37℃で1時間反応させた。反応液にアルカリ-SDS液 [0.2N NaOH、1% (W/V) SDS] 40mlを添加し、緩やかに混和して室温にて15分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液 [5M酢酸カリウム溶液60ml、酢酸11.5ml、蒸留水28.5mlの混合液] 30mlを添加し、充分混和してから氷水中に15分間静置した。

【0051】溶菌物全量を遠心管に移し、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、上澄液を得た。これに等量のフェノールークロロホルム液 (フェノール:クロロホルム=1:1混和液) を加え懸濁した後、遠心管に移し、室温下で5分間、15,000×gの遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に2倍量のエタノールを加え、-20℃で1時間静置後、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、沈殿を回収した。

【0052】沈殿を減圧乾燥後、TE緩衝液 [トリス10mM、EDTA 1mM; HClにてpH 8.0に調整] 2mlに溶解した。溶解液に塩化セシウム溶液 [5倍濃度のTE緩衝液100mlに塩化セシウム17.0gを溶解させた液] 15mlと10mg/mlエチジウムプロマイド溶液1mlを加えて、密度を1.392g/mlに合わせた。この溶液を12℃で42時間、11.6,000×gの遠心分離を行った。

【0053】プラスミドp BY 5 0 3は紫外線照射により遠心管内で下方のバンドとして見い出される。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜きとることにより、プラスミドp BY 5 0 3を含む分画液を得た。次いでこの分画液を等量のイソアミルアルコールで4回処理してエチジウムプロマイドを抽出除去し、その後にTE緩衝

液に対して透析を行った。このようにして得られたプラスミドp BY 5 0 3を含む透析液に3M酢酸ナトリウム溶液を最終濃度30mMに添加した後、2倍量エタノールを加え、-20℃1時間静置した。この溶液を15,000×gの遠心分離にかけてDNAを沈降させ、プラスミドp BY 5 0 3を50μg得た。

【0054】(B) プラスミドベクターp CRY 3 0の作成

プラスミドp HSG 2 9 8 (宝酒造製) 0.5μgに制限酵素Sal I (5 units) を37℃1時間反応させ、プラスミドDNAを完全に分解した。前記(A)項で調製したプラスミドp BY 5 0 3の2μgに制限酵素Xba I (1 unit) を37℃で30分間反応させ、プラスミドDNAを部分分解した。両者のプラスミドDNA分解物を混合し、制限酵素を不活性化するために65℃で10分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々50mMトリス緩衝液pH 7.6、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mMジチオスレイトール、1mM ATP及びT4DNAリガーゼ1unitになるように各成分を強化し、16℃で15時間保温した。この溶液を用いてエシェリヒア・コリJM109コンピテンテントセル (宝酒造製) を形質転換した。

【0055】形質転換株は30μg/ml (最終濃度) のカナマイシン、100μg/ml (最終濃度) のIP TG (イソプロビル-β-D-チオガラクトピラノシド) 100μg/ml (最終濃度) のX-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド) を含むし培地 (トリプトン10g、酵母エキス5g、NaCl 5g及び蒸留水1l、pH 7.2) で37℃にて24時間培養し、生育株として得られた。これらの生育株のうち、白いコロニーで生育してきたものを選択し、各々プラスミドをアルカリ-SDS法 [T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, "Molecular cloning" (1982), 90-91参照] により抽出した。

【0056】その結果、プラスミドp HSG 2 9 8のSal I部位にプラスミドp BY 5 0 3由来の約4.0kbの断片が挿入されたプラスミドp HSG 2 9 8-oriが得られた。次に同様の方法を用い、前記(A)項で得られたプラスミドp BY 5 0 3 DNAを制限酵素Kpn I及びEco RIにて処理して得られる約2.1kbのDNA断片を上記プラスミドp HSG 2 9 8-oriのKpn I及びEco RI部位にクローニングし、プラスミドベクターp CRY 3 0を調製した。

【0057】実施例4

プラスミドp CRY 3 0-secYの作成及びコリネ型細菌への導入

実施例1の(C)項で得られたプラスミドp U C 1 1 8-secY 5μgを制限酵素Kpn Iを各5units

用い、37℃で1時間反応させ分解したものと、実施例3の(B)項で得られたプラスミドpCRY30-1μgを制限酵素KpnI 1unitを用い、37℃で1時間反応させ分解したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub> およびT4DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従い前記エシエリヒア・コリJM109株を形質転換し、カナマイシン50μg/mlを含む培地[トリプトン10g、イーストエキストラクト5g、NaCl 5g及び寒天16gを蒸留水1lに溶解]に塗抹した。

【0058】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ8.6kbのDNA断片に加え、大きさ1.5kbの挿入DNA断片が認められた。上記の如く調製されたプラスミドDNAを、コリネ型細菌へ形質転換した。

【0059】形質転換は、電気パルス法を用いて次のとおり行った。プレビバクテリウム・フラバムMJ-23

3(FERM BP-1497)プラスミドpBY50-2除去株を100mlの前記A培地で対数増殖初期まで培養し、ペニシリンGを1ユニット/mlになるように添加して、さらに2時間振盪培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を20mlのパルス用溶液(272mM Sucrose、7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1mM MgCl<sub>2</sub>; pH7.4)にて洗浄した。さらに菌体を遠心分離して集め、5mlのパルス用溶液に懸濁し、0.75mlの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50μlとを混合し、水中にて20分間静置した。ジーンバルサー(バイオラド社製)を用いて、2500ボルト、25μFDに設定し、パルスを印加後氷中に20分間静置した。全量を3mlの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン15μg/ml(最終濃度)を含む前記A寒天培地に植菌し30℃で2~3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施例3(A)項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の第3表に示す。

#### 【0060】

#### 【表3】

第3表 プラスミドpCRY30-secY

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ(kb)
EcoRI	1	10.1
BamHI	1	10.1
KpnI	2	8.6, 1.5
XbaI	1	10.1

【0061】上記制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-secYと命名した。なお、プラスミドpCRY30-secYにより形質転換されたプレビバクテリウム・フラバムMJ233-secYは、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院微生物工業技術研究所に、平成4年1月24日付で:微研菌寄第13302号(FERM-13302)として寄託されている。

#### 【0062】

【配列表】配列番号: 1

配列の長さ: 1320

#### 配列

```

GTG TCC GCC ATT ATT CAG GCA TTC AAG GAC GCG GAT CTG CGT AAG AAG
Val Ser Ala Ile Ile Gln Ala Phe Lys Asp Ala Asp Leu Arg Lys Lys
      1           5           10          15
ATT TTC TTC ACT ATC GCC ATG ATC GTT CTA TAC CGC ATC GGT GCG CAG
Ile Phe Phe Thr Ile Ala Met Ile Val Leu Tyr Arg Ile Gly Ala Gln
      20          25          30
ATC CCT TCC CCG GGA GTT GAC TAT GCA ACG ATT AGT GGT CGT CTG CGT
Ile Pro Ser Pro Gly Val Asp Tyr Ala Thr Ile Ser Gly Arg Leu Arg
      35          40          45
GAC TTG ACT CAG GAT CAG TCA AGC GTT TAT TCG CTG ATT AAC CTG TTT

```

Asp Leu Thr Gln Asp Gln Ser Ser Val Tyr Ser Leu Ile Asn Leu Phe  
 50 55 60  
 TCC GGT GGA GCG CTG CTG CAG CTG TCC ATT TTT GCT ATT GGT ATC ATG  
 Ser Gly Gly Ala Leu Leu Gln Leu Ser Ile Phe Ala Ile Gly Ile Met  
 65 70 75 80  
 CCG TAC ATC ACG GCG TCT ATT ATC GTG CAG CTG CTG ACT GTG GTT ATT  
 Pro Tyr Ile Thr Ala Ser Ile Ile Val Gln Leu Leu Thr Val Val Ile  
 85 90 95  
 CCA CAC TTT GAG GAG TTG AAG AAG GAA GGC CAG TCT GGC CAG GCC AAG  
 Pro His Phe Glu Glu Leu Lys Lys Glu Gly Gln Ser Gly Gln Ala Lys  
 100 105 110  
 ATG ATG CAG TAC ACC AGG TAC TTA ACG GTT GCC TTG GCG TTG CTT CAG  
 Met Met Gln Tyr Thr Arg Tyr Leu Thr Val Ala Leu Ala Leu Gln  
 115 120 125  
 TCT TCG GGC ATC GTC GCG TTG GCG GAC CGT GAG CAG CTG CTT GGC GCA  
 Ser Ser Gly Ile Val Ala Leu Ala Asp Arg Glu Gln Leu Leu Gly Ala  
 130 135 140  
 GGC ATT CGC GTG CTG TCG GCT GAT CGC AAC TTC TTC GAC CTC ATT GTT  
 Gly Ile Arg Val Leu Ser Ala Asp Arg Asn Phe Phe Asp Leu Ile Val  
 145 150 155 160  
 TTG GTC ATC ACC ATG ACT GCG GGT GCA GTG CTT GTG ATG TGG ATG GGT  
 Leu Val Ile Thr Met Thr Ala Gly Ala Val Leu Val Met Trp Met Gly  
 165 170 175  
 GAG CTC ATC ACG GAA AAG GGC GTA GGC AAT GGT ATG TCG CTG CTG ATT  
 Glu Leu Ile Thr Glu Lys Gly Val Gly Asn Gly Met Ser Leu Leu Ile  
 175 180 185  
 TTC GCT GGT ATC GCA ACT CGC CTC CCA ACT GAT GGC ATG AAC ATT CTG  
 Phe Ala Gly Ile Ala Thr Arg Leu Pro Thr Asp Gly Met Asn Ile Leu  
 190 195 200  
 GGC AAC TCC GGC GGC GTG GTT TTC GCT GTT CTG GCT TCC GTT CTG  
 Gly Asn Ser Gly Gly Val Val Phe Ala Val Val Leu Ala Ser Val Leu  
 205 210 215  
 ATC CTG GTC ATT GGT GTT GTA TTC GTT GAG CAG GGC CAG CGT CGT ATT  
 Ile Leu Val Ile Gly Val Val Phe Val Glu Gln Gly Gln Arg Arg Ile  
 220 225 230 235  
 CCA GTG CAG TAC GCA AAG CCC ATG CTG GGT CGT CGT CAG TAC GGT GGT  
 Pro Val Gln Tyr Ala Lys Arg Met Val Gly Arg Arg Gln Tyr Gly Gly  
 240 245 250  
 TCT TCC ACT TAC CTG CCT TTG AAG GTC AAC CAA GCT GGT GTT ATC CCA  
 Ser Ser Thr Tyr Leu Pro Leu Lys Val Asn Gln Ala Gly Val Ile Pro  
 255 260 265  
 GTG ATC TTC GCG TCT TCC TTG ATT TAC ATG CCA GTG CTG ATT ACT CAG  
 Val Ile Phe Ala Ser Ser Leu Ile Tyr Met Pro Val Leu Ile Thr Gln  
 270 275 280  
 ATC GTG AAC TCT GGT TCG CTG GAA GTG TCT GAT AAC TGG TGG CAG CGC  
 Ile Val Asn Ser Gly Ser Leu Glu Val Ser Asp Asn Trp Trp Gln Arg  
 285 290 295  
 AAC ATC ATT GCG CAC CTG CAG ACG CCT TCT TCC TGG CAG TAC ATT GTT  
 Asn Ile Ile Ala His Leu Gln Thr Pro Ser Ser Trp Gln Tyr Ile Val  
 300 305 310 315

### 【図面の簡単な説明】

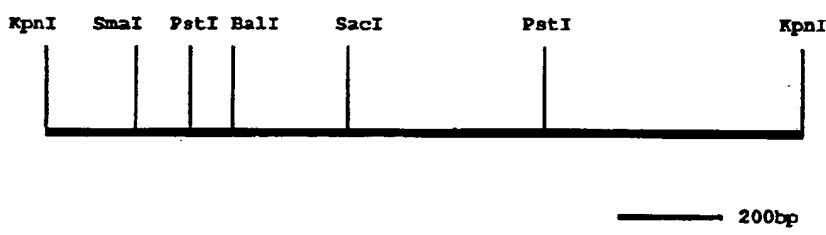
## 【図1】本発明のsecY遺伝子DNAを含むDNA断片の制限酵素による切断点地図

【図2】大きさが約1.5 kbの本発明のs.e.c.Y遺伝子

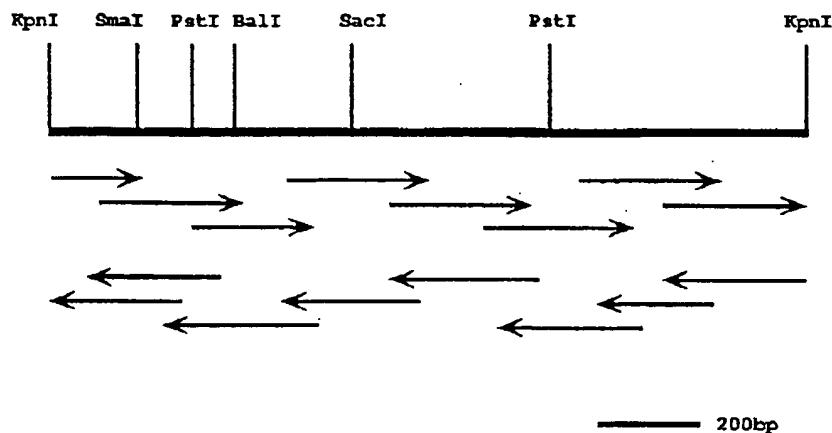
## 子DNAを含むDNA断片の塩基配列決定のための戦略図。

【図3】本発明のプラスマドpCRY30-secYの制限酵素の切断点地図。

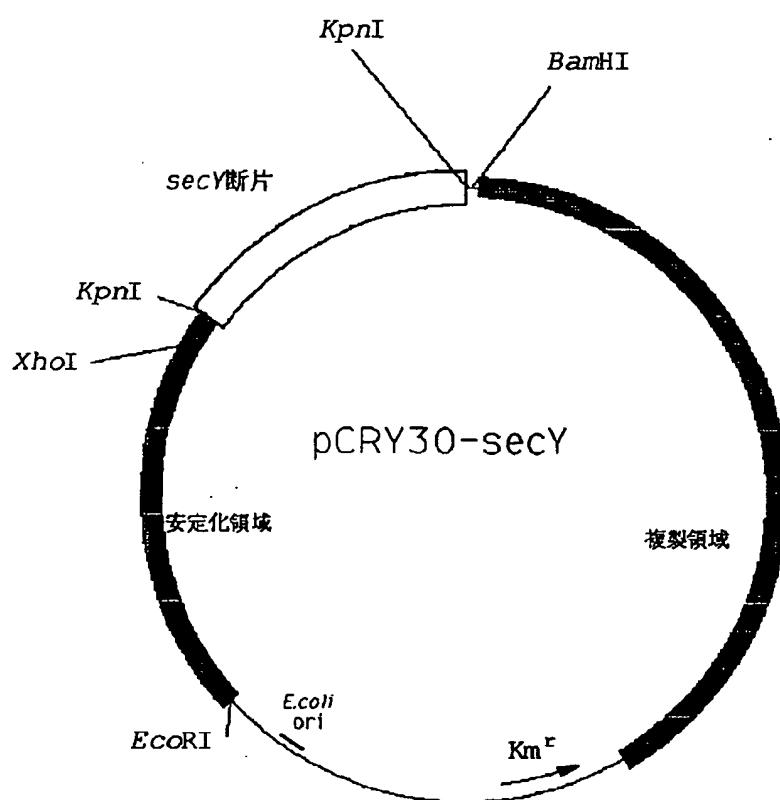
[図1]



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>  
// C 1 2 P 21/02 識別記号 庁内整理番号 F I  
(C 1 2 N 1/21 C 8214-4 B 技術表示箇所  
(C 1 2 R 1:13)  
(C 1 2 P 21/02  
(C 1 2 R 1:13)

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-261766

(43)公開日 平成6年(1994)9月20日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup> 識別記号 厅内整理番号 F I 技術表示箇所  
C 12 N 15/54 ZNA  
C 12 P 13/08 A 2121-4B  
// (C 12 N 15/54  
C 12 R 1:13)  
9050-4B C 12 N 15/ 00 A  
審査請求 未請求 請求項の数 8 OL (全 28 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 (22)出願日	特願平5-55451 平成5年(1993)3月16日	(71)出願人 000006057 三菱油化株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号 (72)発明者 佐藤 幸江 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱油化株式会社筑波総合研究所内 (72)発明者 巻野 信剛 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱油化株式会社筑波総合研究所内 (72)発明者 小林 幹 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱油化株式会社筑波総合研究所内 (74)代理人 弁理士 山本 隆也 最終頁に続く
---------------------	-------------------------------	---

(54)【発明の名称】 フィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA及び  
(57)【要約】 その利用

【構成】 AEC耐性を有しかつL-リジン生産性の増加したプレビバクテリウム・フラバムMJ233から単離した、L-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA。

【効果】 このフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNAを導入したコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドで形質転換されたプレビバクテリウム・フラバムMJ233株は、L-リジンの生成量が顕著に増加した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ブレビバクテリウム属細菌由来のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスバルトキナーゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項2】 ブレビバクテリウム属細菌がブレビバク

テリウム・フラバム (Brevibacterium flavum) MJ 233 である請求項1記載の遺伝子DNA。

【請求項3】 次のDNA塩基配列

GTGGCCCTGG TCGTACAGAA ATATGGCGGT TCCTCGCTTG AGAGTCGGGA ACGCATTAGA 60  
AACGTCGCTG AACGGATCGT TGCCACCAAG AAGGCTGGAA ATAATGTCGT GGTTGTCGCC 120  
TCCGCAATGG GAGACACCAC GGATGAGCTT CTAGAACTTG CTGCGGCAGT GAATCCCGTT 180  
CCCGCAGCTC GTGAAATGGA TATGCTCCCTG ACTGCTGGTG AGCGTATTTC TAACGCTCTC 240  
GTCGCCATGG CTATTGAGTC CCTGGGTCCA GAGGCTCAAT CTTTCACCGG TTCTCAGGCT 300  
GGTGTGCTCA CCACCGAGCG TCACGGAAAC GCACGGCATG TTGATGTCAC TCCAGGTGCT 360  
GTGCGTGAAG CACTCGATGA GGGCAAGATC TGCAATTGTTG CTGGTTTCCA GGGTGTCAAT 420  
AAGGAAACCC GCGATGTCAC CACGTTGGGT CGCGGTGGTT CTGATACACAC TGCAGTTGCA 480  
TTGGCAGCTG CTCTGAACGC TGATGTTGT GAGATTACT CAGATGTTGA CGGGGTGTCAC 540  
ACCGCTGACC CGCGCATCGT TCCTAATGCT CAGAAGCTGG AAAAGCTCAG CTTCGAAGAA 600  
ATGCTGGAAC TTGCTGCTGT TGGCTCCAAG ATTTGGTGC TACGCACTGTG TGAATACCGCT 660  
CGTGCATTCA ATGTCGCACT TCGCGTACGC TCGTCTTATA GCAATGATCC CGGCACCTTG 720  
ATTGCCGGCT CTATGGAGGA TATTCCTGTG GAAGAAGCAG TCCCTTACCGG TGTCGCAACC 780  
GACAAGTCCG AAGCCAAGT AACCGTTCTG GGTATTTCGG ATAAGGCCAGG CGAGRYTGG 840  
AAGGTTTCC GTGCGTTGGC TGATGCAGAA ATCAACATTG ACATGGTTCT GCAGAACGTC 900  
TYCTCTGTGG AAGACGGCAC CAYCGACATC ACGTTCACCT GCGCTCGCTC TGACGGACGC 960  
CGTGCAGATGG AGATCTGAA GAAGCTTCAG GTTCAGGGCA ACTGGACCAA TGTGTTTAC 1020  
GACGACCAAGG TCGGCAAGT CTCCCTCGTG GGTGGGGCA TGAAGTCTCA CCCAGGTGTT 1080  
ACCGCAGAGT TCATGGAAGC TCTGCGCGAT GTCAACCTGA ACATCGAATT GATTTCACC 1140  
TCTGAGATCC GCATTTCCGT GCTGATCCGT GAAGATGATC TGGATGCTGC TGACCGTGC 1200  
CTGCATGAGC AGTTCAGCT GGGCGGCCAA GACGAAGCCG TCGTTATGCC AGGCACCGA 1260  
CGC 1263

(配列中、835番目のRはG又はAを示し、836番目、902番目および923番目のYはC又はTを示し、同時に、835番目のRがGであり、836番目、902番目および923番目のYがCであることはない。)

で表されるL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスバルトキナーゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項4】 次のアミノ酸配列

Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala  
1 5 10 15  
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala  
20 25 30  
Gly Asn Asn Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp  
35 40 45  
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg  
50 55 60  
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu  
65 70 75 80  
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr  
85 90 95  
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg  
100 105 110  
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly  
115 120 125  
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg  
130 135 140  
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala

145	150	155	160
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val			
165	170	175	
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys			
180	185	190	
Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly			
195	200	205	
Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn			
210	215	220	
Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu			
225	230	235	240
Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr			
245	250	255	
Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile			
260	265	270	
Ser Asp Lys Pro Gly Glu AAA Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp			
275	280	285	
Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val YYY Ser Val Glu			
290	295	300	
Asp Gly Thr ZZZ Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg			
305	310	315	320
Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr			
325	330	335	
Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala			
340	345	350	
Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu			
355	360	365	
Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg			
370	375	380	
Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala			
385	390	395	400
Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr			
405	410	415	
Ala Gly Thr Gly Arg			
420			

(配列中、279番目のAAAはAla又はThr又はValを示し、301番目のYYYはSer又はPheを示し、308番目のZZZはThr又はIleを示し、同時に、279番目のAAAがAlaであり、301番目のYYYがSerであり、308番目のZZZがThrであることはない。)で表されるL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド。

【請求項6】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAと、コリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNAを保有する組換えプラスミド。

【請求項7】 請求項6記載の組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌。

【請求項8】 グルコースを、請求項7記載のコリネ型細菌の培養菌体又は菌体処理物と接触させてL-リジンを生成せしめることを特徴とするL-リジンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、プレビバクテリウム属細菌由来のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ (E. C. 2.7. 2. 4. )をコードする遺伝子DNA、該遺伝子DNAを含む組換えプラスミド、該プラスミドで形質転換されたコリネ型細菌及び該コリネ型細菌を用いるL-リジンの製造法に関する。

【0002】L-リジンは、必須アミノ酸として蛋白質中にその存在が知られ、医薬や食品添加物として用いられている。

### 【0003】

【従来の技術】従来、L-リジンの工業的製造法としては、グルタミン生産菌であるコリネ型細菌の各種栄養要求株、各種薬剤耐性株、各種薬剤感受性株を用いてL-リジンを製造する方法が知られている【例えば、特公昭51-21078号公報、特公昭53-1833号公報、特公昭62-8692号公報等参照】。また、組換え菌を用いた製造法も提案されている【特開昭56-160997号公報、特開昭60-62994号公報、特開昭62-7978号公報等参照】。しかしながら、従来提案されている方法によるL-リジンの製造法では、対糖収率が低く及び／又はL-リジンの蓄積に限界があり、新たな観点から、遺伝子工学的手法による菌株の改良等を含め、L-リジンをより効率的に生成させる方法の提供が強く求められている。

【0004】L-リジン生合成経路において、L-アスパラギン酸を初発とする第一ステップでアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) によりL-アスパラギン酸にリン酸が付加される。該アスパルトキナーゼは、最終生成物であるL-リジンにより阻害を受ける、即ちフィードバックインヒビションを受け、培地中にある濃度以上L-リジンを蓄積させることができない。このことが、微生物を用いるL-リジンの製造上の問題となっていた。

【0005】一方、アスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 由来の遺伝子 [Journal of Biological Chemistry, 256, 10228~10230, 1981参照] がよく研究されている。また、グラム陽性細菌由来のアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) としては、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*)、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Coryneform glutamicum*) 等が知られている [Journal of Biological Chemistry, 262, 8787~8798, 1987; Molecular Microbiology, 5, 1197~1204, 1991参照]。しかしながら、プレビバクテリウム属由来のアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子については従来の報告例は見当らない。

【0006】本発明者等は、先にプレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ 233株染色体より、アスパルトキナーゼ遺伝子を単離し、該遺伝子を適当なベクターブラスミドに導入して、コリネ型細菌を形質転換し、該形質転換されたコリネ型細菌を用いると、効率的にL-リジンを製造しうることを見い出し提案した (特願平4-24658号明細書参照)。

### 【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、プレビバクテリウム属細菌由来のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子DNAを単離し、該遺伝子を同種であるコリネ型細菌に導入し、該コリネ型細菌を用いて、新たな観点からさらに効率的にL-リジンを製造することである。

### 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、S- (2-アミノエチル) -L-システィン (以下これを「AEC」と略称することがある) 耐性を有するプレビバクテリウム属細菌染色体より、L-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子DNAが単離可能であり、該遺伝子DNAを適当なベクターブラスミドに導入して、コリネ型細菌を形質転換し、該形質転換されたコリネ型細菌を用いると、さらに効率的にL-リジンを製造し得ることを見い出し本発明を完成するに至った。

### 【0009】かくして本発明によれば、

- (1) プレビバクテリウム属細菌由来のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA;
- (2) 後記配列表の配列番号6で示されるDNA塩基配列で表されるL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA;
- (3) 後記配列表の配列番号7で示されるアミノ酸配列で表されるL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA;
- (4) 該遺伝子DNAが導入された組換えブラスミド;
- (5) 該組換えブラスミドで形質転換されたコリネ型細菌; 及び
- (6) 該形質転換されたコリネ型細菌を用い、グルコースを原料としてL-リジンを製造する方法が提供される。

【0010】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。本発明の「L-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA」とは、AECを含有するプレートに生育可能なコリネ型細菌のうち、リジンの生育量が増加した株の染色体より抽出したアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA、すなわちL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子DNAを意味するものである。

【0011】本発明のL-リジンによるフィードバックインヒビションが解除されたアスパルトキナーゼをコー

ドする遺伝子を含むDNA断片（以下、これを「A断片」と略称することがある）は、その塩基配列が決定された後においては合成することも可能であるが、通常はAEC耐性を有するアスパルトキナーゼ生産性微生物からクローニングされる場合が多く、その供給源となる微生物としては、AEC耐性を有するプレビバクテリウム属細菌、特にAEC耐性を有するプレビバクテリウム・フラバム（*Brevibacterium flava* m）MJ 233（FERM BP-1497）およびその由来株が有利に使用される。

【0012】すなわち、A断片の好適な供給源微生物としてはアスパルトキナーゼ生産性微生物を変異処理し、AEC耐性を有したL-リジンの生産性の増加した微生物が使用される。変異処理を行なう微生物としては、上記したプレビバクテリウム属細菌、特にプレビバクテリウム・フラバム（*Brevibacterium flava* m）MJ 233（FERM BP-1497）およびその由来株が有利に使用される。

【0013】これらの微生物を変異処理してA断片を調製するための基本的操作の一例を述べれば次のとおりである：先ず、プレビバクテリウム・フラバムMJ 233にN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトログアニジン処理により変異を誘起せしめた後、この菌懸濁液をAEC 10g/1含有する平板培地〔尿素0.2%、硫酸0.7%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05%、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 6mg/1、MnSO<sub>4</sub> · 4~6H<sub>2</sub>O 6mg/1、ローピオチン200μg/1、チアミン塩酸塩100μg/1、寒天20g/1、グルコース2%（滅菌後添加）〕に塗抹し、し、30℃にて3日間培養し、生じたコロニーを分離することにより、AECに耐性を有する変異株プレビバクテリウム・フラバムMJ 233を得ることができる。

【0014】上記のようにして得られた変異株を好気的に培養して、培地中に生成蓄積するL-リジンの含量が親株より増加しているものをさらに選抜することにより、AEC耐性を有したL-リジン生産性の増加したプレビバクテリウム・フラバムMJ 233を取得することができる。かくして得られるA断片の供給源となる微生物の好適具体例として以下の菌株を挙げることができる。

【0015】プレビバクテリウム・フラバムMJ 233-Leu-AEC-Lys 163（FERM P-13512）、プレビバクテリウム・フラバムMJ 233-AEC-Lys 84（FERM P-13511）、プレビバクテリウム・フラバムMJ 233-AEC-Lys 242（FERM P-13513）、プレビバクテリウム・フラバムMJ 233-AEC-Lys 40（FERM P-16510）。

【0016】これら変異株の菌学的性質は、AEC耐性

およびL-リジン生産性増加を除いては、親株であるプレビバクテリウム・フラバムMJ 233と同様である

（菌学的性質については、特開昭51-130592号公報参照）。次に、上記したAEC耐性を有し、かつL-リジン生産性の増加したプレビバクテリウム・フラバムMJ 233株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばEcoRIを用いて染色体DNAを完全に分解する。

【0017】得られるDNA断片をクローニングベクター、例えばpHSG399（宝酒造製）に挿入し、このベクターを用いて、アスパルトキナーゼ遺伝子が欠損した大腸菌（エシエリヒア・コリ）変異株CGSC 5074（エシエリヒア・コリ ジエネティック・ストック センター（*Escherichia coli* Genetic Stock Center）、デパートメント・オブ・バイオロジー、エール・ユニバーシティ（Department of Biology, Yale University）；P. O. Box 6666 New Haven, CT 06511-744、U. S. A. 保存菌株）を形質転換し、AECを含有する選択培地に塗抹することにより、形質転換株を取得する。

【0018】得られる形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたAEC耐性を有したL-リジン生産性の増加したプレビバクテリウム・フラバムMJ 233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。かくして得られるA断片をさらに適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を、大腸菌で複製可能なベクタープラスミドに挿入し、このベクタープラスミドを、通常用いられる形質転換法、例えば、塩化カルシウム法、電気パルス法等による形質転換により、これを前記アスパルトキナーゼが欠損した大腸菌変異株に導入し、AECを含有する選択培地に塗抹する。

【0019】得られる形質転換体よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたAEC耐性を有したL-リジン生産性の増加したプレビバクテリウム・フラバムMJ 233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。このようにして得られるA断片の一つは、上記AEC耐性を有したL-リジン生産性の増加したプレビバクテリウム・フラバムMJ 233株の染色体DNAを制限酵素EcoRIの完全分解により切り出し、さらにそれを制限酵素NruIで切断することによって得られる大きさが約1.7kbのDNA断片を挙げることができる。

【0020】この約1.7kbのL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を、各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記表1に、制限酵素による切断点地図を図1にそ

れぞれ示す。

【0021】

【表1】

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
Pvu II	3	0.1, 0.2, 0.7, 0.7
Dra I	1	0.2, 1.5
Hinc II	2	0.3, 0.6, 0.7
Hind III	1	0.4, 1.2
Bgl II	2	0.5, 0.6, 0.6
Pst I	2	0.4, 0.6, 0.7
Nco I	1	0.5, 1.2
Xba I	1	0.4, 1.3

【0022】なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0023】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのラムダファージ( $\lambda$  phage)のDNAを制限酵素Hind IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ( $\phi$ X174 phage)のDNAを制限酵素Hae IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1 kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果を採用し、約0.1 kbから1 kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0024】一方、上記のAEC耐性を有しかつL-リジン生産性の増加したプレビバクテリウム・フラバムMJ233の染色体DNAを制限酵素Nru IおよびEco RIによって切断することにより得られる大きさが約1.7 kbのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119(宝酒造製)を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法(dideoxy chain termination法、Sanger, F. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, p5463, 1977)により決定することができる。このようにして決定した上記約1.7 kbのDNA断片の塩基配列のオープンリーディングフレームの存在から決定したL-リジンによる

フィードバックインヒビションが解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子は、後記配列表の配列番号2~5に示す配列を有するものであり、421個のアミノ酸をコードする1263の塩基対から構成されている。

【0025】なお、後記配列表の配列番号1に、比較对照としてAECを含有しない選択培地を用いた他は同様の方法で単離・配列を決定したプレビバクテリウム・フラバムMJ233染色体由来のアスパルトキナーゼ遺伝子(以下これを「野生型のアスパルトキナーゼ遺伝子」ということがある。)DNAの配列を示す。また、配列番号2に前記MJ233-Leu-AEC-Lys163株より得られた配列、配列番号3にMJ233-AECA-Lys84株より得られた配列、配列番号4にMJ233-AEC-Lys242株より得られた配列、配列番号5にMJ233-AEC-Lys40株より得られた配列をそれぞれ示す。

【0026】後記配列表の配列番号1~5に示される配列から明らかなるとおり、L-リジンによりフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子DNAは、野生型のアスパルトキナーゼ遺伝子DNAと比較して、835番目、836番目、902番目、923番目の塩基がそれぞれGからA、CからT、CからTに変異することによって、279番目、279番目、301番目、308番目のアミノ酸がそれぞれAlaからThr、AlaからVal、SerからPhe、ThrからIleに変化したものである。

【0027】また、逆に、この配列をもとにして、サイトダイレクトミュータジェネシス(Site-directed mutagenesis法、Kramer, W. et. al. Nucl. Acids Res., 12, p9441, 1984)を用いて人为的に変異を導入することによっても、AEC耐性を付与する変異型アスパルトキナーゼ遺伝子を得ることができる。

【0028】これらの結果から、本発明のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子DNAは、後記配列表の配列番号6に示される塩基配列又は配列番号7に示されるアミノ配

列で表されるDNAであることが判明した。上記の塩基配列を包含する本発明のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片は、天然のAEC耐性を有するプレビバクテリウム属細菌染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばベックマン社製System-1 Plusを用いて合成されたものであってもよい。

【0029】また、前記の如くAEC耐性を有するプレビバクテリウム・フラバムMJ233変異株の染色体DNAから取得される本発明のDNA断片は、L-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片に包含されるものである。

【0030】本発明のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片（A断片）は、適當なプラスミド、例えば、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少くとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でアスパルトキナーゼの高発現可能な組換えプラスミドを得ることができる。

【0031】また、本発明のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を発現させるためのプロモーターはコリネ型細菌が保有する該遺伝子自身のプロモーターであることができるが、それに限られるものではなく、アスパルトキナーゼ遺伝子の転写を開始させるための原核生物由来の塩基配列であればいかなるプロモーターであってもよい。

【0032】本発明のA断片を導入することができる、コリネ型細菌内の複製増殖機能を司る遺伝子を少くとも含むプラスミドベクターとしては、例えば、特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30；特開平2-276575号公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX；特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2及びpCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ184；特開昭57-134500号に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4及びpCG

11等を挙げることができる。

【0033】中でもコリネ型細菌の宿主ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子とをもつものが好ましく、例えば、プラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX等が好適に使用される。

【0034】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法としては、プレビバクテリウム・スタチオニス（*Brevibacterium stationis*）IFO12144（FERM BP-2515）からプラスミドpBY503（このプラスミドの詳細については特開平1-95785号公報参照）DNAを抽出し、制限酵素XbaIで大きさが約4.0kbのプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片（以下これを「複製機能領域」と言うことがある。）を切り出し、制限酵素EcoRIおよびKpnIで大きさが約2.1kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片（以下これを「安定化機能領域」と言うことがある。）を切り出す。これらの両断片をプラスミドpHSG298（宝酒造製）のEcoRI、KpnI部位及びSalI部位に組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0035】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のA断片の導入は、例えばプラスミドベクター中に1個所だけ存在する制限酵素部位を、該制限酵素で開裂し、そこに前記A断片および開裂したプラスミドベクターを必要に応じてS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするか、または適當なアダプター-DNAの存在下にDNAリガーゼ処理で連結させることにより行うことができる。

【0036】プラスミドpCRY30への本発明のA断片の導入は、プラスミドpCRY30を制限酵素EcoRIで開裂させ、そこに前記アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片（A断片）をDNAリガーゼで連結させることにより行うことができる。このようにして造成されるプラスミドpCRY30に本発明の大きさが約1.7kbのA断片を導入した組換えプラスミドは、L-リジンの製造に好適に用いることができる組換えプラスミドの一つであり、本発明者らはこれをプラスミドpCRY30-AK835と命名した。プラスミドpCRY30-AK835の作成方法の詳細については、後記実施例5で説明する。

【0037】このようにして造成されるL-リジンによるフィードバックインヒビションが解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子を含むコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドを、宿主微生物に導入して該微生物の培養物を用いてL-リジンを安定に効率よく生産することができる。

可能となる。本発明によるプラスミドで形質転換しうる宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばプレビパクテリウム・フラバムMJ 233 (FERM BP-1497)、プレビパクテリウム・フラバムMJ 233-A B-41 (FERM BP-1498)、プレビパクテリウム・フラバムMJ 233-ABT-11 (FERM BP-1500)、プレビパクテリウム・フラバムMJ 233-ABD-21 (FERM BP-1499) 等が挙げられる。

【0038】なお、上記のFERM BP-1498の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としてDL- $\alpha$ -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール資化性微生物である(特公昭59-28398号公報第3~4欄参照)。また、FERM BP-1500の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としたL- $\alpha$ -アミノ酪酸トランスマニナーゼ高活性変異株である(特開昭62-51998号公報参照)。さらに、FERM BP-1499の菌株はFERM BP-1497の菌株を親株としたD- $\alpha$ -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株である(特開昭61-177993号公報参照)。

【0039】これらの微生物の他に、プレビパクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC6871、同ATCC13745、同ATCC13746; プレビパクテリウム・デバリカタム (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC14020; プレビパクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869; コリネパクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831等を宿主微生物として用いることもできる。

【0040】なお、宿主としてプレビパクテリウム・フラバムMJ 233由來の菌株を用いる場合、本菌株が保有するプラスミドpBY502(特開昭63-36787号公報参照)のため、形質転換が困難である場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。そのようなプラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより自然に欠失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である [Bact. Rev. 36 p. 361~405 (1972) 参照]。上記プラスミドpBY502を人為的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。

【0041】宿主プレビパクテリウム・フラバムMJ 233の生育を不完全に阻害する濃度のアクリジンオレンジ(濃度: 0.2~50  $\mu$ g/ml)もしくはエチジウムプロミド(濃度: 0.2~50  $\mu$ g/ml)等を含む培地に、1ml当たり約10細胞になるように植菌し、生

育を不完全に阻害しながら約24時間約35°Cで培養する。培養液を希釈後寒天培地に塗布し、約35°Cで約2日培養する。出現したコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミドpBY502が除去されている株を選択する。この操作によりプラスミドpBY502が除去されたプレビパクテリウム・フラバムMJ 233由來菌株が得られる。

【0042】このようにして得られるプレビパクテリウム・フラバムMJ 233由來菌株への前記プラスミドの形質転換法としては、エシェリヒア・コリ及びエルビニア・カロトボラについて知られているように [Calvin, N. M. and Hanawalt, P. C., Journal of Bacteriology, 170, 2796 (1988); Ito, K., Nishida, T. and Izaki, K., Agricultural and Biological Chemistry, 52, 293 (1988) 参照]、DNA受容菌へのパルス波通電 [Satoh, Y. et al., Journal of Industrial Microbiology, 5, 159 (1990) 参照]によりプラスミドを導入することが可能である。

【0043】上記の方法で形質転換して得られるL-リジンによるフィードバックインヒビションが解除されたアスパルトキナーゼ産性能を有するコリネ型細菌、例えばプレビパクテリウム・フラバムMJ 233由來株の培養方法を以下に述べる。培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通常の栄養培地で行うことができ、炭素源としては、例えばグルコース、エタノール、メタノール、醣蜜等が、そして窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素等がそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また、無機塩としては、例えば、リン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスティーブリカ、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等の栄養素を培地に添加することができる。

【0044】培養は、通常、通気攪拌、振盪等の好気条件下に、約20~約40°C、好ましくは約25°C~約35°Cの温度で行うことができる。培養中のpHは5~10、好ましくは7~8付近と/orすることができ、培養中のpH調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。培養開始時の炭素源濃度は、好ましくは1~5容量%、更に好ましくは2~3容量%である。また、培養期間は通常1~7日間と/orすることができ、最適期間は3日間である。

【0045】このようにして得られる培養物から各々菌体を集めて、水又は適当な緩衝液で洗浄し、L-リジン生成反応に使用することができる。L-リジン生成反応においては、これらの菌体をそのまま用いることができ、あるいは超音波処理等を加えた菌体破碎物、さらに

それから分離回収した粗酵素又は精製酵素として、あるいはそれらを適当な担体に固定化して用いることができる。以上に述べた如き菌体の破碎物や粗または精製酵素、固定化物等を本明細書ではまとめて「菌体処理物」という。

【0046】しかして本発明に従えば、グルコースを、上記培養菌体又は菌体処理物と接触させて、L-リジンを生成せしめることからなるL-リジンの製造法が提供される。グルコースと上記培養菌体又は菌体処理物との接触は、通常の酵素反応と同様に、水性媒体中において、好ましくは約20～約40℃、特に約25～約35℃において行なうことができる。

【0047】生成するL-リジンは例えば、高速液体クロマトグラフィー等の手段により反応液から分離回収することができる。

#### 【0048】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。

##### 参考例1

プレビバクテリウム・フラバムMJ 233由来のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A断片)のクローニング

##### 【0049】(A) プレビバクテリウム・フラバムMJ 233の全DNAの抽出

半合成培地A培地〔組成：尿素2g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g、MgSO<sub>4</sub> 0.5g、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 6mg、MnSO<sub>4</sub> 4～6H<sub>2</sub>O 6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ビオチン200μg、塩酸チアミン200μg、グルコース20g、蒸留水1リットル〕1リットルに、プレビバクテリウム・フラバムMJ 233(FERM BP-1497)を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む10mM NaCl-20mMトリス緩衝液(pH8.0)-1mM EDTA-2Na溶液1.5mlに懸濁した。次にプロテナーゼKを、最終濃度が100μg/mlになるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間保温して容菌した。この溶菌液に、等量のフェノール／クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離(5,000×g、20分間、10～12℃)し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10mMトリス緩衝液(pH7.5)-1mM EDTA-2Na溶液5mlを加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

##### 【0050】(B) 組換え体の創製

上記(A)項で得たプレビバクテリウム・フラバムMJ 233の全DNA溶液の90μlを制限酵素EcoRI 50unitsを用い、37℃で1時間反応させ完全分解した。このEcoRI分解DNAにクローニングベクターpHSG399(宝酒造より市販)を制限酵素EcoRIで切断した後、脱リン酸化処理したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>及びT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で15時間反応させ、結合させた。

##### 【0051】(C) アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むプラスミドの選択

上記遺伝子の選抜に用いたアスパルトキナーゼ欠損大腸菌変異株は、エシェリヒア・コリCGSC5074(t<sub>hr</sub> A1101, lys C1001, met L1000)である〔( )内はアスパルトキナーゼ遺伝子型(Genotype)を示す〕。

【0052】上記(B)項で得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法(Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970)により前記エシェリヒア・コリCGSC5074株を形質転換し、クロラムフェニコール50mgを含む選択培地[K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.1g、グルコース20g及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解]に塗抹した。

【0053】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpHSG399の長さ2.2kbのDNA断片に加え、長さ約3.8kbの挿入DNA断片が認められた。本プラスミドをpHSG399-AKと命名した。

##### 【0054】(D) アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A)断片のサブクローニング

上記(C)項で得たプラスミドpHSG399-AKに含まれるDNA挿入断片を、必要な部分だけに小型化するために、プラスミドpUC119(宝酒造より市販)ヘアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を下記のとおりサブクローニングした。

【0055】上記(C)項で得たプラスミドpHSG399-AKを制限酵素EcoRI、NruIで切断したもののと、プラスミドpUC119を制限酵素EcoRI、SmaIで切断したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>及びT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ、結合

させた。

【0056】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) により前記エシェリヒア・コリ CGSC 5074 株を形質転換し、アンピシリン 50 mg を含む選択培地 [K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 g, グルコース 20 g 及び寒天 16 g を蒸留水 1 リットルに溶解] に塗抹した。

【0057】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースグル電気泳動を

用いて調べたところ、プラスミド pUC 119 の長さ

3. 2 kb のDNA断片に加え、長さ約 1. 7 kb の挿入DNA断片が認められた。各種の制限で切断したときの、長さ約 1. 7 kb のDNA断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは前記表 1 に示したものと同様であり、このDNA断片の制限酵素切断点地図も図 1 に示したものと同様であった。

【0058】また上記で得たプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表 2 に示す。

【0059】

【表 2】

プラスミド pUC 119-AK		
制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamH I	1	4. 9
Bgl II	2	4. 2, 0. 6
Hind III	2	3. 6, 1. 2

【0060】上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドを pUC 119-AK と命名した。以上によりアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含む大きさが約 1. 7 kb のDNA断片 (Nru I-Eco RI 断片) を得ることができた。

【0061】参考例 2

アスパルトキナーゼをコードする遺伝子の塩基配列の決定

実施例 1 の (D) 項で得られたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含む長さが約 1. 7 kb のDNA断片について、その塩基配列をプラスミド pUC 118 または pUC 119 (宝酒造製) を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination 法) (Sanger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977) により図 2 に示した戦略図に従って決定した。

【0062】その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、アスパルトキナーゼをコードする遺伝子は、後記配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する 421 個のアミノ酸をコードする 1263 の塩基対により構成されていることが判明した。

【0063】参考例 3

コリネ型細菌内で複製し安定なプラスミドベクター pCR Y30 の作成

(A) プラスミド pBY 503 の調製

プラスミド pBY 503 は、プレビバクテリウム・スタチオニス IFO 12144 (FERM BP-2515) から分離された分子量約 10 メガダルトンのプラスミドであり、特開平 1-95785 号公報に記載のようにして調製した。

【0064】半合成培地 A 培地 [尿素 2 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

4. 0.5 g, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 6 mg, MnSO<sub>4</sub> · 4 · 6H<sub>2</sub>O 6 mg、酵母エキス 2.5 g、カゼミノ酸 5 g、ピチオン 200 μg、塩酸チアミン 200 μg、グルコース 20 g 及び蒸留水 1 リットル] 1 リットルに、プレビバクテリウム・スタチオニス IFO 12144 を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を 10 mg/m<sup>l</sup> の濃度にリゾチームを含む緩衝液 [25 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、10 mM の EDTA、50 mM グルコース] 20 ml に懸濁し、37 °C で 1 時間反応させた。反応液にアルカリ-SDS 液 [0.2 N NaOH、1% (W/V) SDS] 40 ml を添加し、緩やかに混和して室温にて 15 分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液 [5 M 酢酸カリウム溶液 60 ml、酢酸 11.5 ml、蒸留水 28.5 ml の混合液] 30 ml を添加し、充分混和してから氷水中に 15 分間静置した。

【0065】溶菌物全量を遠心管に移し、4 °C で 10 分間、15,000 × g の遠心分離にかけ、上澄液を得た。これに等量のフェノール-クロロホルム液 (フェノール:クロロホルム = 1:1 混和液) を加え懸濁した後、遠心管に移し、室温下で 5 分間、15,000 × g の遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に 2 倍量のエタノールを加え、-20 °C で 1 時間静置後、4 °C で 10 分間、15,000 × g の遠心分離にかけ、沈殿を回収した。

【0066】沈殿を減圧乾燥後、TE 緩衝液 [トリス 10 mM、EDTA 1 mM; HCl にて pH 8.0 に調整] 2 ml に溶解した。溶解液に塩化セシウム溶液 [5 倍濃度の TE 緩衝液 100 ml に塩化セシウム 170 g を溶解させた液] 15 ml と 10 mg/m<sup>l</sup> エチジウムプロマイド溶液 1 ml を加えて、密度を 1.392 g/m<sup>l</sup> に合わせた。この溶液を 12 °C で 42 時間、11

6, 000×gの遠心分離を行った。

【0067】プラスミドpBY503は紫外線照射により遠心管内で下方のバンドとして見い出される。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜きとることにより、プラスミドpBY503を含む分画液を得た。次いでこの分画液を等量のイソアミルアルコールで4回処理してエチジウムプロマイドを抽出除去し、その後にTE緩衝液に対して透析を行った。このようにして得られたプラスミドpBY503を含む透析液に3M酢酸ナトリウム溶液を最終濃度3.0mMに添加した後、2倍量エタノールを加え、-20°C 1時間静置した。この溶液を15, 000×gの遠心分離にかけてDNAを沈降させ、プラスミドpBY503を50μg得た。

【0068】

(B) プラスミドベクターpCRY30の作成

プラスミドpHSG298(宝酒造製) 0.5μgに制限酵素SalI(5units)を37°C 1時間反応させ、プラスミドDNAを完全に分解した。前記(A)項で調製したプラスミドpBY503の2μgに制限酵素XbaI(1unit)を37°Cで30分間反応させ、プラスミドDNAを部分分解した。

【0069】両者のプラスミドDNA分解物を混合し、制限酵素を不活性化するために65°Cで10分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々5.0mMトリス緩衝液pH7.6、1.0mM MgCl<sub>2</sub>、1.0mMジチオスレイトール、1mM ATP及びT4 DNAリガーゼ1unitになるように各成分を強化し、16°Cで15時間保温した。この溶液を用いてエシェリヒア・コリJM109コンピテントセル(宝酒造製)を形質転換した。

【0070】形質転換株は3.0μg/ml(最終濃度)のカナマイシン、100μg/ml(最終濃度)のIPTG(イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド)100μg/ml(最終濃度)のX-gal(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド)を含むL培地(トリプトン10g、酵母エキス5g、NaCl 5g及び蒸留水1リットル、pH7.2)で37°Cにて24時間培養し、生育株として得られた。これらの生育株のうち、白いコロニーで生育してきたものを選択し、各々プラスミドをアルカリ-SDS法(T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, "Molecular cloning" (1982) p90~91参照)により抽出した。

【0071】その結果、プラスミドpHSG298のSalI部位にプラスミドpBY503由来の約4.0kbの断片が挿入されたプラスミドpHSG298-oriが得られた。次に同様の方法を用い、前記(A)項で得られたプラスミドpBY503DNAを制限酵素KpnI及びEcoRIにて処理して得られる約2.1kb

のDNA断片を上記プラスミドpHSG298-oriのKpnI及びEcoRI部位にクローニングし、プラスミドベクターpCRY30を調製した。

【0072】参考例4

プラスミドpCRY30-AKの作成及びコリネ型細菌への導入

参考例1の(C)項で得られたプラスミドpHSG39-AK 5μgを制限酵素EcoRIおよびKpnIを各5units用い、37°Cで1時間反応させ分解したもののと、EcoRIリンク (宝酒造より市販) 1μlを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、1.0mMジチオスレイトール、1mM ATP、1.0mM MgCl<sub>2</sub> およびT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12°Cで15時間反応させ結合させた。

【0073】このDNAを制限酵素EcoRI 3unitsを用い37°Cで1時間反応させ分解したもののと、参考例3の(B)項で得られたプラスミドpCRY30 1μgを制限酵素EcoRI 1unitを用い、37°Cで1時間反応させ分解したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、1.0mMジチオスレイトール、1mM ATP、1.0mM MgCl<sub>2</sub> およびT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12°Cで15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従い前記エシェリヒア・コリCGSG5074株を形質転換し、カナマイシン50μg/mlを含む選択培地[K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g、グルコース20g及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解]に塗抹した。

【0074】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ8.6kbのDNA断片に加え、大きさ約1.7kbの挿入DNA断片が認められた。上記の如く調製されたプラスミドDNAを、コリネ型細菌へ形質転換した。

【0075】形質転換は、電気パルス法を用いて次のとおり行った。プレビバクテリウム・フラバムMJ233(FERM BP-1497)プラスミドpBY502除去株を100mlの前記A培地で対数増殖初期まで培養し、ベニシリングを1ユニット/mlになるように添加して、さらに2時間振盪培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を20mlのパルス用溶液(2.72mM sucrose、7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1mM MgCl<sub>2</sub>; pH7.4)にて洗浄した。さらに菌体を遠心分離してを集め、5mlのパルス用溶液に懸滴し、0.75mlの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50μlとを混合し、水中にて20分間静置した。ジーン

パルサー（バイオラド社製）を用いて、2500ボルト、25μFDに設定し、パルスを印加後氷中に20分間静置した。全量を3mlの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン15μg/ml（最終濃度）を含む前記A寒天培地に植菌し30℃で2~3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施

例3（A）項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表3に示す。

【0076】

【表3】

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ（kb）
BamHI	1	10.4
KpnI	1	10.4
SacI	1	10.4
XbaI	1	10.4
EcoRI	2	1.7, 8.7
XbaI	2	3.4, 7.0
SphI	3	1.7, 2.1, 6.6
PstI	4	0.4, 1.7, 3.3, 5.0

【0077】上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-AKと命名した。なお、プラスミドpCRY30-AKにより形質転換されたプレビバクテリウム・フラバムMJ233-AKは、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院生命工学工業技術研究所に、微研菌寄第12658号（FERM P-12658）として寄託されている。

【0078】実施例1

プレビバクテリウム・フラバムMJ233のAEC耐性変異株の取得

1) AEC耐性株の分離

培地（尿素0.4%、硫酸1.4%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 6mg/l、MnSO<sub>4</sub>·4~6H<sub>2</sub>O 6mg/l、ビオチン200μg/l、チアミン塩酸塩100μg/l、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.1%）50mlを500ml1容三角フラスコに分注、滅菌し、pH7に調節した後、プレビバクテリウム・フラバムMJ233を植菌し、無菌的にグルコースを5g/lの濃度になるように加え、30℃にて2日間振盪培養を行なった。

【0079】菌体を回収し、TMバッファー（Tris 2.4, 2g/l、マレイン酸23.2g/lの液を25mlと0.2N NaOH 15mlを混合し、100mlにメスアップする）5mlで1回洗浄を行なった。N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトログアニジン300μg/mlを含む上記TMバッファーに菌を懸滴し、30℃で2時間インキュベートした。

【0080】この菌体処理液を上記培地（カザミノ酸、酵母エキスを除く）にて2回洗浄したのち、AEC 10g/lを含有する平板培地（尿素0.2%、硫酸0.7%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 6mg/l、MnSO<sub>4</sub>·4~6H<sub>2</sub>O 6mg/l、

mg/l、ロービオチン200μg/l、チアミン塩酸塩100μg/l、寒天20g/l、グルコース2%（滅菌後添加）]に塗抹し、30℃にて3日間培養し、生じたコロニーを分離した。

【0081】次に生じたコロニーを100mlの上記培地を用いて培養し、集菌後2回洗浄し、L-リジンの定量を行なった。L-リジンの定量は、高速液体クロマトグラフィー（島津LC-5A）を用いて行なった。この結果、AEC耐性株中にL-リジンの生成量が、野生型に比べて著しく増大した株が存在し、これを次のとおり命名した。

【0082】プレビバクテリウム・フラバムMJ233-Leu-AEC-Lys163 (FERM P-13512)、プレビバクテリウム・フラバムMJ233-AEC-Lys84 (FERMP-13511)、プレビバクテリウム・フラバムMJ233-AEC-Lys242 (FERMP-13513)、プレビバクテリウム・フラバムMJ233-AEC-Lys40 (FERMP-13510)。

【0083】上記した各菌株は、茨城県つくば市東1丁目1番1号の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。これらの菌株を以下の実験に用いた。

【0084】

2) AEC耐性株のアスパルトキナーゼ活性の測定

培地（尿素0.4%、硫酸アンモニウム1.4%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2ppm、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2ppm、MnSO<sub>4</sub>·4~6H<sub>2</sub>O 2ppm、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2ppm、NaCl 2ppm、ビオチン200μg/l、チアミン・HCl 100μg/l、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.1%）10mlを24φ試験管に分注、滅菌（滅菌後pH7.0）した後上記1)項で得たAEC耐性を有するプレビバクテリウム・フラバ

ム (*Brevibacterium flavidum*) を各々植菌し、無菌的にグルコースを 5 g / m l の濃度になるように加え、30℃にて2日間振盪培養を行った。

【0085】次に、本培養培地 (グルコース 5%、硫酸アンモニウム 2.3%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05%、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 20 ppm、MnSO<sub>4</sub> · 4 · 6H<sub>2</sub>O 20 ppm、ビオチン 200 μg / l、チアミン · HC1 100 μg / l、カザミノ酸 0.1%、酵母エキス 0.3%) の 100 m l を 500 m l 容三角フラスコに分注、滅菌 (120℃、20分間) 後、前記前培養物の 1 m l を添加して温度 33℃にて 24 時間培養を行った。

【0086】培養終了後、培養物 100 m l から遠心分離にて集菌後、脱塩蒸留水にて洗浄した菌体を 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) で 1 回洗浄後、同緩衝液を 2 m l 添加し、ガラスピーズ 1 g を加えた。超音波にて菌体を破碎した後、12,000 rpm、40 分間遠心し上清を得た。アスパルトキナーゼ活性を測定する反応液 [アスパラギン酸カリウム (pH 8) 1050 mM、ATP 20 mM、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 30 mM、Tris · HC1 (pH 8) 100 mM、ヒドロキシルアミン 600 mM] に調製した上清 0.1 m l を加え全体を 1 m l にしたのち、37℃で 1 時間反応させた。これに 2.5 m l の呈色液 [5% FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O と、12% TCA と 3N HC1 を等量混合したもの] を添加し、遠心後上清の 540 nm の吸光度を測定した。

【0087】反応液にスレオニン (Thr)、リジン (Lys) をまったく無添加のときの値を 100 とし、これに対する Thr、Lys をそれぞれ 100 mM、200 mM 添加したときの割合を、脱感作度と定義した。野生型の株のアスパルトキナーゼの脱感作度は 0% であるのに対し、変異株 MJ 233-Leu-AEC-Lys 163、MJ 233-AEC-Lys 84、MJ 233-AEC-Lys 40 ではそれぞれ 70%、50%、80%、40% であった。すなわち AEC 耐性の変異株 1、2、3、4、では、アスパルトキナーゼが Lys、Thr に対するフィードバックインヒビションが解除されていることが確認された。

#### 【0088】実施例 2

##### フィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子の単離および同定

実施例 1 で得られた各菌株を同様の培地で培養し以下の方法で染色体 DNA を回収した。

【0089】得られた菌体を 10 mg / m l の濃度にリゾチームを含む 10 mM NaCl - 20 mM トリス緩衝液 (pH 8.0) - 1 mM EDTA - 2 Na 溶液 15 m l に懸濁した。次にプロテナーゼ K、最終濃度が

100 μg / m l になるように添加し、37℃で 1 時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が 0.5% になるように添加し、50℃で 6 時間保温して溶菌した。この溶菌液に、等量のフェノール / クロロホルム溶液を添加し、室温で 10 分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離 (5,000 × g、20 分間、10 ~ 12℃) し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを 0.3 M となるように添加した後、2 倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在する DNA をガラス棒でまきとり、70% エタノールで洗浄した後、風乾した。得られた DNA に 10 mM トリス緩衝液 (pH 7.5) - 1 mM EDTA - 2 Na 溶液 5 m l を加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

【0090】次に、上記で各菌株から得られた染色体 DNA を制限酵素 EcoRI、NruI 各 10 units で完全に分解し、プラスミド pUC119 を制限酵素 EcoRI、SmaI 各 2 units で切断したものを各々混合し、50 mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP、10 mM MgCl<sub>2</sub> 及び T4 DNA リガーゼ 1 unit の各成分を添加し 12℃で 16 時間反応させ結合させた。

【0091】得られた各プラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology 53, 159, 1970) により、前記アスパルトキナーゼ欠損大腸菌変異株、エシェリヒア・コリ CGSC 5074 (thr A1101, lys C1001, met L1000) [( ) 内はアスパルトキナーゼ遺伝子型 (genotype) を示す] を各々形質転換し、アンピシリン 50 mg を含む選択培地 [K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 g、グルコース 20 g、寒天 16 g、1 リットルにメスアップ] に各々塗抹した。生育してきた各コロニーを AEC 5 g / l を含む同選択培地に各々塗抹し、AEC 耐性であることを確認した。

【0092】この各々の培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液より各プラスミド DNA を抽出し、該プラスミドを制限酵素により各々切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミド pUC119 の長さ 3.2 kb の DNA 断片に加え、長さ約 1.7 kb の插入 DNA 断片が認められた。各種の制限で切断したときの、長さ約 1.7 kb の DNA 断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは、各変異株から得られたものとも同種であり、前記表 1 に示したとおりであった。

【0093】また上記で得た MJ 233-Leu-AEC-Lys 163 より得られた 1.7 kb の DNA 断片が導入されたプラスミド (プラスミド pUC119-AK835) を各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさ

さを測定した。その結果を下記の表4に示す。

【0094】

表4 制限酵素	プラスミドpUC119-AK835	
	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamH I	1	4. 9
Bgl II	2	4. 2, 0. 6
Hind III	2	3. 6, 1. 2

【0095】なお、他変異株から得られた1. 7 kbのDNA断片が導入された各プラスミドの制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは表4に示したものと同様であった。

【0096】実施例3

フィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子の塩基配列の決定

実施例2で得られたフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子DNA断片について、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119を用いるジヌクレオチド酵素法(dideoxy chain termination法、Songer et al., Proc. Natl. Acad. Res. USA., 74, 5463, 1977)により決定した。

【0097】その塩基配列中のオーブンリーディングフレームの存在から、フィードバックインヒビションが解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子は、後記配列表の配列番号2～5に示す塩基配列を有する421個のアミノ酸をコードする1263塩基対より構成されていることが判明した。その配列は、野生型のアスパルトキナーゼ配列(配列番号1)と比べて、835番目のGがAに変異することにより279番目のアミノ酸がAlaからThrに変化したもの(配列番号2)、836番目のCがTに変異することにより279番目のアミノ酸がAlaからValに変化したもの(配列番号3)、902番目のCがTに変異することにより301番目のアミノ酸がSerからPheに変化したもの(配列番号4)、923番目のCがTに変化することにより308番目のアミノ酸がThrからIleに変化したもの(配列番号5)であることがわかった。

【0098】実施例4

サイトダイレクトミュータジエネシスによる人為的フィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子の作成

野生型アスパルトキナーゼ遺伝子がpUC119にクローニングされたプラスミドpUC119-AK(参考例1)を用いて下記の方法にて変異を導入した。

【0099】まず、pUC119-AKを含むエシエリヒア・コリJM109(宝酒造製)にM13KO7ファージ(宝酒造製)を感染させて常法に従い1本鎖DNAを作製した。この1本鎖DNAと、pUC119を95℃、5分間加熱し急冷したものを混合し、アニーリング

【表4】

させることにより、野生型アスパルトキナーゼ遺伝子部分が1本鎖でベクター部分が2本鎖である分子を形成させた。

【0100】これに実施例3で見い出した変異部分を中心含む25merの1本鎖合成DNAを4種類作製しそれぞれ混合した。さらにDNAポリメラーゼによりギャップを修復したのち、それぞれ、実施例1で使用したアスパルトキナーゼ欠損大腸菌変異株、エシエリヒア・コリCGSC5074株に導入し、AEC10g/lを含む前記選択培地に塗抹した。

【0101】生じたコロニーよりそれぞれプラスミドを抽出し、実施例3と同様の方法で塩基配列を決定したところ、それぞれ配列番号2～5に示した配列と全く同様の配列を有していた。

【0102】実施例5

プラスミドpCRY30-AK835の作成及びコリネ型細菌への導入

実施例2で得られたプラスミドpUC119-AK835 5  $\mu$ gを制限酵素EcoRIおよびNruIを各5 units用い、37℃で1時間反応させ分解したものと、EcoRIリンクー(宝酒造より市販)1  $\mu$ lを混合し、5.0mMトリス緩衝液(pH7.6)、1.0mMジチオスレイトール、1mM ATP、1.0mM MgCl<sub>2</sub>およびT4 DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。

【0103】このDNAを制限酵素EcoRI 3 unitsを用い37℃で1時間反応させ分解したものと、参考例3の(B)項で得られたプラスミドpCRY30 1  $\mu$ gを制限酵素EcoRI 1 unitを用い、37℃で1時間反応させ分解したものを混合し、5.0mMトリス緩衝液(pH7.6)、1.0mMジチオスレイトール、1mM ATP、1.0mM MgCl<sub>2</sub>およびT4 DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従い前記エシエリヒア・コリCGSC5074株を形質転換し、カナマイシン50  $\mu$ g/mlを含む選択培地[K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1g, グルコース 20g及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解]に塗抹した。

【0104】この培地上の生育株を常法により液体培養

し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ8.6 kbのDNA断片に加え、大きさ1.7 kbの挿入DNA断片が認められた。上記の如く調製されたプラスミドDNAを、コリネ型細菌へ形質転換した。

【0105】形質転換は、電気パルス法を用いて次のとおり行った。プレビバクテリウム・フラバムMJ233(FERM BP-1497)プラスミドpBY502除去株を100mlの前記A培地で対数増殖初期まで培養し、ペニシリンGを1ユニット/mlになるように添加して、さらに2時間振盪培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を20mlのパルス用溶液(272mM sucrose、7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7.4)にて洗浄した。さらに菌体を遠心分

離して集め、5mlのパルス用溶液に懸濁し、0.75mlの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50μlとを混合し、水中にて20分間静置した。ジーンペルサー(バイオラド社製)を用いて、2500ボルト、25μFDに設定し、パルスを印加後氷中に20分間静置した。全量を3mlの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン15μg/ml(最終濃度)を含む前記A寒天培地に植菌し30℃で2~3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施例3(A)項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表5に示す。

【0106】

【表5】

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ(kb)
BamHI	1	10.4
KpnI	1	10.4
SacI	1	10.4
XbaI	1	10.4
EcoRI	2	1.7, 8.7
XbaI	2	3.4, 7.0
SphI	3	1.7, 2.1, 6.6
PstI	4	0.4, 1.7, 3.3, 5.0

【0107】上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-AK835と命名した。なお、プラスミドpCRY30-AK835により形質転換されたプレビバクテリウム・フラバムMJ233-AK835は、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院生命工学工業技術研究所に、平成5年3月4日付で受託番号: FERM P-13508として寄託されている。

【0108】実施例6

#### L-リジンの生産

培地(尿素0.4%、硫酸アンモニウム1.4%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.05%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>0.05%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2ppm、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2ppm、MnSO<sub>4</sub>·4~6H<sub>2</sub>O 2ppm、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2ppm、NaCl 2ppm、ビオチン200μg/1、チアミン·HCl 100μg/1、カザミノ酸0.3%、酵母エキス0.3%)の1000mlを2リットル容通気搅拌槽に仕込み、滅菌(120℃、20分間)後、前記前培養物の20mlを添加して、回転数1000rpm、通気量1vvm、温度33℃、pH 7.6にて24時間培養を行った。

【0110】培養終了後、培養物500mlから遠心分離にて集菌後、脱塩蒸留水にて2度洗浄した菌体を反応液[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g/1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g/1; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g/1; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g/1; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 20ppm; MnSO<sub>4</sub>·4~6H<sub>2</sub>O 20ppm; チアミン塩酸塩100μg/1; pH 7.6]の1000mlに懸濁後、該懸濁液を2リットル容通気搅拌槽に仕込み、グルコース9gを添加して、回転数300rpm、通気量0.1vvm、温度33℃、pH 7.6にて24時間反応を行った。

【0111】反応終了後、遠心分離(4000rpm、15分間、4℃)にて除菌した上清液中のL-リジンを定量した。この反応終了後の培養液500mlを、強酸性陽イオン交換樹脂(H<sup>+</sup>型)のカラムに通してL-リ

【0109】次に、本培養培地(グルコース5%、硫酸

ジンを吸着させ、水洗後、0.5Nアンモニア水で溶出させた後、L-リジン画分を濃縮し、冷エタノールでL-リジンの結晶を析出させた。

【0112】また、比較例として、同様の条件にて、プレビバクテリウム・フラバム MJ233 (FERM B P-1497) およびプレビバクテリウム・フラバム M

J233-AK (FERM P-12658) を培養し、同様の条件にて反応させた後にL-リジンを定量し、同様の条件にてL-リジンの結晶を得た。それらの結果を表6に示す。

【0113】

【表6】

表6

菌株	プラスミド	L-リジン生成量	結晶析出量
MJ233-AK835	pCRY30-AK835	8.0 g/1	2000 mg
MJ233-AK	pCRY30-AK	1.5 g/1	400 mg
MJ233	---	0.6 g/1	120 mg

【0114】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 1263

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: プレビバクテリウム フラバム

株名: MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号: peptide

存在位置: 1-1263

特徴を決定した方法: P

【0115】

配列

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GCC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG  
 Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala  
 1 5 10 15  
 GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT  
 Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala  
 20 25 30  
 GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TCC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT  
 Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp  
 35 40 45  
 GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT  
 Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg  
 50 55 60  
 GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC  
 Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu  
 65 70 75 80  
 GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GGT CAA TCT TTC ACG  
 Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr  
 85 90 95  
 GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC  
 Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg  
 100 105 110  
 ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC  
 Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly  
 115 120 125  
 AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC  
 Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg  
 130 135 140  
 GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA  
 Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala  
 145 150 155 160

TTG GCA GCT CTG AAC CCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT  
 Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val  
     165            170            175  
 GAC GCC GTG TAC ACC CCT GAC CCG CCC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG  
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys  
     180            185            190  
 CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC  
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly  
     195            200            205  
 TCC AAG ATT TTC GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT  
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn  
     210            215            220  
 GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG  
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu  
     225            230            235            240  
 ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC  
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr  
     245            250            255  
 GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT  
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile  
     260            265            270  
 TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT  
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp  
     275            280            285  
 GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA  
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu  
     290            295            300  
 GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TCC CCT CGC TCT GAC GGA CGC  
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg  
     305            310            315            320  
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr  
     325            330            335  
 AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG  
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala  
     340            345            350  
 GGC ATG AAG TCT CAC CCA CGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG  
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu  
     355            360            365  
 CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC  
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg  
     370            375            380  
 ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA  
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Arg Ala  
     385            390            395            400  
 CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT  
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr  
     405            410            415  
 GCA GGC ACC GGA CGC  
 Ala Gly Thr Gly Arg  
     420

【0116】配列番号:2

配列の長さ:1263

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:Genomic DNA

起源

生物名:プレビバクテリウム フラバム

株名: MJ233-Leu-AEC-Lys163

配列の特徴

特徴を表す記号:peptide

存在位置:1-1263

特徴を決定した方法:E

【0117】

配列

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG  
Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala  
1 5 10 15  
GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT  
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala  
20 25 30  
GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT  
Gly Asn Asn Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp  
35 40 45  
GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT  
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg  
50 55 60  
GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC  
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu  
65 70 75 80  
GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG  
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr  
85 90 95  
GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC  
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg  
100 105 110  
ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC  
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly  
115 120 125  
AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC  
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg  
130 135 140  
GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA  
Asp Val Thr Leu Gly Arg Gly Ser Asp Thr Ala Val Ala  
145 150 155 160  
TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT  
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val  
165 170 175  
GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG  
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys  
180 185 190  
CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC  
Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly  
195 200 205  
TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC ACT GTT GAA TAC GCT GCT CGT GCA TTC AAT  
Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn  
210 215 220

GTG CCA CTT CGC GTC CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG  
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu  
 225 230 235 240  
 ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTC GAA GAA GCA GTC CTT ACC  
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr  
 245 250 255  
 GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GGC AAA GTC ACC GTT CTG GGT ATT  
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile  
 TCC GAT AAG CCA GGC GAG ACT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT  
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Thr Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp  
 275 280 285  
 GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA  
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu  
 290 295 300  
 GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CCC  
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg  
 305 310 315 320  
 CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC  
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr  
 325 330 335  
 AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG  
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala  
 340 345 350  
 GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG  
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu  
 355 360 365  
 CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC  
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg  
 370 375 380  
 ATT TCC CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA  
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala  
 385 390 395 400  
 CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT  
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr  
 405 410 415  
 GCA GGC ACC GGA CGC  
 Ala Gly Thr Gly Arg  
 420

【0118】配列番号：3

配列の長さ：1263

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：ブレビバクテリウム フラバム

株名：MJ233-AEC-Lys84

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-1263

特徴を決定した方法：E

【0119】

配列

GTG GCC CTG GTC GTC CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG  
 Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala  
 1 5 10 15  
 GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT

Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala  
 20 25 30  
 GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT  
 Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp  
 35 40 45  
 GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT  
 Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg  
 50 55 60  
 GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC  
 Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu  
 65 70 75 80  
 GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG  
 Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr  
 85 90 95  
 GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC  
 Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg  
 100 105 110  
 ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC  
 Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly  
 115 120 125  
 AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC  
 Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg  
 130 135 140  
 GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA  
 Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala  
 145 150 155 160  
 TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT  
 Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val  
 165 170 175  
 GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG  
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys  
 180 185 190  
 CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC  
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly  
 195 200 205  
 TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC CCT CGT GCA TTC AAT  
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn  
 210 215 220  
 GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG  
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu  
 225 230 235 240  
 ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC  
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr  
 245 250 255  
 GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT  
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile  
 260 265 270  
 TCC GAT AAG CCA GGC GAG GTT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT  
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Val Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp  
 275 280 285

GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA  
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu  
 290 295 300  
 GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC  
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg  
 305 310 315 320  
 CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC  
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr  
 325 330 335  
 AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG  
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala  
 340 345 350  
 GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTC  
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu  
 355 360 365  
 CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC  
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg  
 370 375 380  
 ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCA CGT GCA  
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Arg Ala  
 385 390 395 400  
 CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GGC GTC GTT TAT  
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr  
 405 410 415  
 GCA GGC ACC GGA CGC  
 Ala Gly Thr Gly Arg  
 420

【0120】配列番号：4

配列の長さ：1263

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：プレビバクテリウム フラバム

株名：MJ233-AEC-Lys242

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-1263

特徴を決定した方法：E

【0121】

配列

GTG GCC CTG GTC GTC CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG ACT GCG  
 Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala  
 1 5 10 15  
 GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT  
 Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Ala  
 20 25 30  
 GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT  
 Gly Asn Asn Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp  
 35 40 45  
 GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT  
 Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg  
 50 55 60  
 GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC  
 Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu  
 65 70 75 80

GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG  
 Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr  
                   85                  90                  95  
 GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC  
 Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg  
                   100                  105                  110  
 ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC  
 Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly  
                   115                  120                  125  
 AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC  
 Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg  
                   130                  135                  140  
 GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA  
 Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala  
                   145                  150                  155                  160  
 TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT  
 Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val  
                   165                  170                  175  
 GAC GCC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG  
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys  
                   180                  185                  190  
 CTG GAA AAG CTC ACC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC  
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Val Gly  
                   195                  200                  205  
 TCC AAG ATT TTG GTG CTA CCC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT  
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn  
                   210                  215                  220  
 GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG  
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu  
                   225                  230                  235                  240  
 ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC  
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr  
                   245                  250                  255  
 GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTC ACC GTT CTG GGT ATT  
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile  
                   260                  265                  270  
 TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT  
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp  
                   275                  280                  285  
 GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TTC TCT GTG GAA  
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Phe Ser Val Glu  
                   290                  295                  300  
 GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC  
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg  
                   305                  310                  315                  320  
 CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC  
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr  
                   325                  330                  335  
 AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG  
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala

340	345	350
GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG		
Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu		
355	360	365
GGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC		
Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg		
370	375	380
ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT CCT GCT GCA CGT GCA		
Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala		
385	390	395
CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT		
Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr		
405	410	415
GCA GGC ACC GGA CGC		
Ala Gly Thr Gly Arg		
420		

【0122】配列番号: 5

配列の長さ: 1263

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: ブレビバクテリウム フラバム

株名: MJ233-AEC-Lys40

配列の特徴

特徴を表す記号: peptide

存在位置: 1-1263

特徴を決定した方法: E

【0123】

配列

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG			
Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala			
1	5	10	15
GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT			
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala			
20	25	30	
GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT			
Gly Asn Asn Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp			
35	40	45	
GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT			
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg			
50	55	60	
GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC			
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu			
65	70	75	80
GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG			
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr			
85	90	95	
GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC			
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg			
100	105	110	
ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CCT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC			
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly			
115	120	125	
AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC			
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg			

130	135	140
GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA		
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala		
145	150	155
TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT		
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val		
165	170	175
GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG		
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys		
180	185	190
CTG GAA AAG CTC ACC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC		
Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly		
195	200	205
TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT		
Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn		
210	215	220
GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG		
Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu		
225	230	235
ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC		
Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr		
245	250	255
GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTC ACC GTT CTG GGT ATT		
Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile		
260	265	270
TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT		
Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp		
275	280	285
GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA		
Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu		
290	295	300
GAC GGC ACC ATC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC		
Asp Gly Thr Ile Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg		
305	310	315
CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC		
Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr		
325	330	335
AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG		
Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala		
340	345	350
GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG		
Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu		
355	360	365
CCC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC		
Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg		
370	375	380
ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CCT GCA		
Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala		
385	390	395
CTG CAT GAC CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT		

Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr  
 405 410 415  
 GCA GGC ACC GGA CGC  
 Ala Gly Thr Gly Arg  
 420

【0124】配列番号：6

配列の長さ：1263

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：ブレビバクテリウム フラバム

株名：MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-1263

特徴を決定した方法：E

他の情報：835 番目のR はG またはA を示し、836 番目、902 番目および923 番目のY はC またはT を示し、同時に、835 番目のR がG であり、836 番目、902 番目および923 番目のY がC であることはない。

【0125】

配列  
 GTGGCCCTGG TCGTACAGAA ATATGGCGGT TCCTCGCTTG AGAGTGCGGA ACGCATTAGA 60  
 AACGTCGCTG AACGGATCGT TGCCACCAAG AAGGCTGGAA ATAATGTCGT GGTGTCGTC 120  
 TCCGCAATGG GAGACACCAAC GGATGAGCTT CTAGAACTTG CTGGGGCACT GAATCCGTT 180  
 CCGCCAGCTC GTGAAATGGA TATGCTCTG ACTGCTGGTG AGCGTATTTC TAACGCTCTC 240  
 GTCGCGATGG CTATTCACTG CCTGGGTGCA GAGGCTCAAT CTTTCACGGG TTCTCAGGCT 300  
 GGTGTGCTCA CCACCGAGCG TCACGGAAAC GCACGCATTG TTGATGTCAC TCCAGGTCGT 360  
 GTGCGTGAAG CACTCGATCA CGGCAAGATC TGCATTGTTG CTGGTTTCCA GGGTGTCAAT 420  
 AAGGAAACCC CGGATGTCAC CACGTTGGGT CGGGGTGTT CTGATACACAC TGCAGTTCCA 480  
 TTGGCAGCTG CTCTGAAACG TGATGTTGTT GAGATTTACT CAGATGTTGA CGGCGTGTAC 540  
 ACCGCTGACC CGCGCATCGT TCCTAATGCT CAGAAGCTGG AAAAGCTCAG CTTCGAAGAA 600  
 ATGCTGAAAC TTGCTGCTGT TGGCTCCAAG ATTTGGTGC TACGCACTGT TGAATACGCT 660  
 CGTGCATTCA ATGTGCCACT TCCCGTACCG TCGTCTTATA GCAATGATCC CGGCACTTTC 720  
 ATTGCGGCT CTATGGAGGA TATTCCTGTT GAAGAACCG AGTGGTTACCG TGTCGCAACC 780  
 GACAAGTCCC AAGCCAAGT AACCGTTCTG GGTATTTCGG ATAAGCCAGG CGAGRYTCCG 840  
 AAGGTTTCC GTGCGTTGGC TGATGAGAA ATCAACATTC ACATGGTTCT GCAGAACGTC 900  
 TYCTCTGTTG AAGACGGCAC CAYCGACATC ACGTTACCT GCCCTCCCT TGACGGACGC 960  
 CGTGCAGATGG AGATCTGAA GAAGCTTCAG GTTCAGGGCA ACTGGACCAA TGTGTTTAC 1020  
 GACGACCAGG TCCGCAAAGT CTCCCTCGTG GGTGCGGGCA TGAAGTCTCA CCCAGGTGTT 1080  
 ACCGCAAGT TCATGGAAGC TCTGCGGAT GTCAACGCTGA ACATCGAATT GATTTCACC 1140  
 TCTGAGATCC GCATTCCTG GCTGATCCCT GAAGATGATC TGGATGCTGC TGACAGTGCA 1200  
 CTGGCATGAGC AGTTCCAGCT GGGCGGCCAA CACGAAGCCC TCGTTTATGC AGGCACCGGA 1260  
 CGC 1263

【0126】配列番号：7

配列の長さ：421

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：ブレビバクテリウム フラバム

株名：MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-421

特徴を決定した方法：E

他の情報：279 番目のAAA はAla またはThr またはVal を示し、301 番目のYYY はSer またはPhe を示し、308 番目のZZZ はThr またはIle を示し、同時に、279 番目のAAA がAla であり、301 番目のYYY がSer であり、308 番目のZZZ がThr であることはない。

【0127】

配列  
 Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala

20	25	30
Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp		
35	40	45
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg		
50	55	60
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu		
65	70	75
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr		
85	90	95
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg		
100	105	110
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly		
115	120	125
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg		
130	135	140
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala		
145	150	155
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val		
165	170	175
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys		
180	185	190
Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly		
195	200	205
Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn		
210	215	220
Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu		
225	230	235
Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr		
245	250	255
Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile		
260	265	270
Ser Asp Lys Pro Gly Glu AAA Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp		
275	280	285
Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val YYY Ser Val Glu		
290	295	300
Asp Gly Thr ZZZ Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg		
305	310	315
Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr		
325	330	335
Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala		
340	345	350
Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu		
355	360	365
Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg		
370	375	380
Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala		
385	390	395
Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr		
405	410	415
Ala Gly Thr Gly Arg		

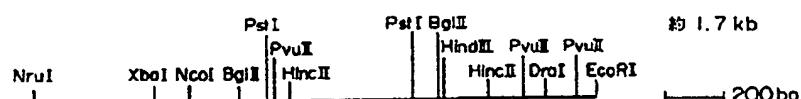
## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のレーリンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片の制限酵素による切断点地図。

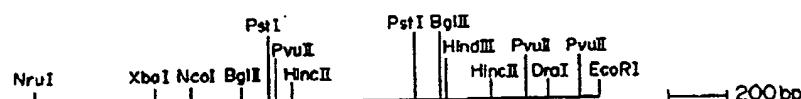
【図2】大きさが約1.7 kbの本発明DNA断片の塩基配列決定のための概略図。

【図3】本発明のプラスミドpCRY30-AK835の制限酵素切断点地図。

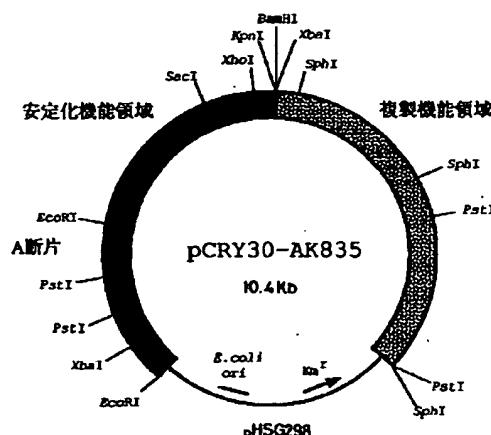
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5

(C 1 2 P 13/08  
C 1 2 R 1:13)

識別記号

府内整理番号

F 1

技術表示箇所

(72)発明者 小浜 恵子  
茨城県稻敷郡阿見町中央8丁目3番1号  
三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 久留主 泰朗  
茨城県稻敷郡阿見町中央8丁目3番1号  
三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 渥川 英明  
茨城県稻敷郡阿見町中央8丁目3番1号  
三菱油化株式会社筑波総合研究所内